



AUTOREFERAT

Omówienie cyklu prac dotyczących osiągnięcia naukowego:

„Hormony płciowe bałtyckiego omułka jadalnego (*Mytilus trossulus*)”

Anna Hallmann

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Kierownik Katedry: dr hab. Tomasz Śledziński

Gdańsk, 2019

1. Informacje wstępne o uzyskanych dyplomach i stopniach naukowych

1994 – 1999 r. - studia na Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego, na kierunku Biologia

7 lipiec 1999 r. - tytuł magistra biologii na podstawie pracy magisterskiej pt. „Subfosylne małżoraczki (*Ostracoda*) profundalu jezior Komorze i Siecino na Pojezierzu Drawskim” wykonanej w Katedrze Genetyki i Cytologii Uniwersytetu Gdańskiego, promotor pracy - prof. dr hab. Tadeusz Sywula

2 grudzień 2008 r. – stopień doktora nauk farmaceutycznych w specjalności biochemia na podstawie pracy doktorskiej pt. „Ocena cytotoksycznego działania menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru w komórkach *choriocarcinoma*” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej, promotor: prof. dr hab. Jerzy Klimek

2. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2000 - 2001 r. – starszy referent inżynierijno-techniczny, Katedra i Zakład Biochemii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny

2002 - 2009 r. – asystent, Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny

od 2009 r. – adiunkt, Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny.

3. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego: **„Hormony płciowe bałtyckiego omułka jadalnego (*Mytilus trossulus*)”**.

b) Wykaz monotematycznych publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone jako osiągnięcie postępowania habilitacyjnego. Informacje o udziale własnym, kopie prac, oświadczenia współautorów o ich udziale w publikacjach wieloautorskich umieszczone są w odpowiednich załącznikach.

W skład osiągnięcia wchodzi cykl 5 publikacji dotyczących charakterystyki płciowych hormonów steroidowych u bałtyckiego omułka jadalnego (*Mytilus trossulus*). Wyniki badań dotyczące tematyki prowadzonych prac zostały przedstawione w postaci monotematycznego cyklu, o łącznym współczynniku oddziaływania **IF: 13,21** i wartości punktacji **MNiSW=160**. Przed doktoratem dorobek stanowiło 13 prac, w tym 7 publikacji o wartości **IF: 10,66** i **96** punktów KBN/MNiSW. Dorobek po doktoracie, poza cyklem objętym osiągnięciem habilitacyjnym, stanowi 5 publikacji o wartości **IF: 13,2** i punktacji **MNiSW=114**. Całkowity dorobek włącznie z pracami opublikowanymi przed doktoratem wynosi **IF: 37,08** i **370 punktów MNiSW**. Indeks-h według bazy Web of Science wynosi **8**, oraz według bazy Scopus wynosi również **8**.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

H1. Sandra Zabrzańska, Katarzyna Smolarz, **Anna Hallmann**, Lucyna Konieczna, Tomasz Bączek, Maciej Wołowicz, 2015, Sex-related differences in steroid concentrations in the blue mussel (*Mytilus edulis trossulus*) from the southern Baltic Sea, Comp. Biochem. Physiol. A., 183, 14-19, IF:2,039 (MNiSW=25) <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.12.029>

H2. Anna Hallmann*, Katarzyna Smolarz, Lucyna Konieczna, Sandra Zabrzeńska, Mariusz Belka, Tomasz Bączek, 2016, LC-MS measurement of free steroids in mussels (*Mytilus trossulus*) from the southern Baltic Sea, J. Pharm. Biomed. Anal., 117, 311-315, IF:3,255 (MNIŚW=35) <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.09.013>

H3. Katarzyna Smolarz, **Anna Hallmann**, Sandra Zabrzeńska, Anna Pietrasik, 2017, Elevated gonadal atresia as biomarker of endocrine disruptors: field and experimental studies using *Mytilus trossulus* (L.) and 17-alpha ethinylestradiol (EE2), Mar. Pollut. Bull., 120, 58-67, IF:3,241 (MNIŚW=40) <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.007>

H4. Katarzyna Smolarz, Sandra Zabrzeńska, Lucyna Konieczna, **Anna Hallmann***, 2018, Changes in steroid profiles of the blue mussel *Mytilus trossulus* as a function of season, stage of gametogenesis, sex, tissue and mussel bed depth, Gen. Comp. Endocrinol., 259, 231-239, IF:2,564 (MNIŚW=25) <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2017.12.006>

H5. Anna Hallmann, Lucyna Konieczna, Justyna Świeżak, Ryszard Milczarek, Katarzyna Smolarz, 2019, Aromatisation of steroids in the bivalve *Mytilus trossulus*, PEER Journal, praca zaakceptowana, nr DOI: [10.7717/peerj.6953](https://doi.org/10.7717/peerj.6953) IF: 2,118 (MNIŚW=35)

* - autor korespondencyjny

c) Uzasadnienie oraz omówienie celu badań i uzyskanych wyników.

Wprowadzenie:

Pierwsze badania opisujące obecność hormonów steroidowych u mięczaków zostały opublikowane w latach 50-tych XX wieku [1,2]. Od tego czasu napisano ponad 200 artykułów naukowych potwierdzających, iż w tkankach mięczaków znajdują się typowe dla kręgowców steroidy, jak również wykazano, że bezkręgowce są zdolne do biosyntezy steroidów *de novo*. Równocześnie stwierdzono, iż mięczaki posiadają specyficzne receptory steroidowe, które wiążą steroidy i w ten sposób regulują funkcje fizjologiczne. Szczególnie dużo uwagi poświęcano bezkręgowcom morskim narażonym na szkodliwe działanie związków chemicznych dostających się do wód i osadów na skutek rosnącej presji antropogenicznej. W ostatnim 20-leciu pojawiło się wiele prac poświęconych specjalnej grupie związków obecnych w środowisku morskim, a mianowicie substancjom chemicznym charakteryzującym się zdolnością wpływania na funkcje endokrynne organizmów żywych, EDs (ang. Endocrine Disruptors). Według wielu naukowców, bezkręgowce narażone na związki o charakterze EDs (np. polichlorowane bifenylole, polichlorowane naftaleny, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, bisfenol A (BPA), nonylfenol, dioksyny i pestycydy) wykazują zmiany w metabolizmie hormonalnym i co za tym idzie zmiany w fizjologii i behawiorze pojedynczych osobników jak i całej populacji. O szczególnie negatywny wpływ na mięczaki posiadają syntetyczne estrogeny (ksenoestrogeny), dostające się do morza na skutek odprowadzania wód z oczyszczalni ścieków (bogatych w estrogeny). Obecność tych ksenoestrogenów w środowisku wodnym może być związana z powszechnym stosowaniem leków hormonalnych w leczeniu weterynaryjnym jak i w hormonalnej terapii zastępczej oraz antykoncepcji. Mechanizm działania ksenoestrogenów oraz pozostałych EDs upatruje się głównie na agonistycznym lub/i antagonistycznym oddziaływaniu tych związków na receptory steroidowe skutkujące w obu przypadkach poważnymi zaburzeniami w regulacji kluczowych szlaków metabolicznych mięczaków [3].

Przełomem w badaniach nad rolą steroidów u mięczaków było opublikowanie przez profesora Alexandra Scotta w 2012 i w 2013 roku artykułów przeglądowych, mocno krytykujących wcześniejsze wyniki uzyskane w obszarze badań obejmujących: wykrywanie hormonów steroidowych w tkankach mięczaków, wskazywanie źródła pochodzenia steroidów oraz wpływ steroidów na fizjologię rozrodu tych zwierząt [4,5]. Autor min. podsumował wyniki ponad 100 publikacji poświęconych tematyce ilościowego określania stężenia hormonów steroidowych u mięczaków. W tkankach bezkręgowców oznacza się głównie testosteron (T), 17 β -estradiol (E2) czy progesteron (P) w różnych stężeniach w zależności od rodzaju tkanki: od wartości 10 pg/gram tkanki [6,7] do 45 ng/gram [8,9]. Tak duży rozrzut w stężeniach steroidów wynika często z faktu, że pomiar ilości tych związków może dotyczyć steroidów zestryfikowanych (wyższe stężenia) jak i „wolnych” (znacznie niższe stężenia). Poza tym, dużą rolę może odgrywać metoda oznaczania steroidów. W pracach wcześniejszych (z końca XX wieku) główną metodą określenia ilości hormonów steroidowych były pomiary radioimmunologiczne (RIA) najczęściej z użyciem izotopu ¹²⁵I, ¹⁴C czy ³H. Wykorzystywano również testy immunoenzymatyczne (EIA, ELISA). Wadą oznaczeń immunochemicznych jest możliwość zajścia reakcji krzyżowych pomiędzy steroidami bądź też innymi związkami wiążącymi się do tego samego przeciwciała [10]. Dlatego też aktualne pomiary steroidów w tkankach bezkręgowców są głównie prowadzone z wykorzystaniem technik chromatograficznych. Próbkę poddaje trawieniu enzymatycznemu lub saponifikacji, ekstrakcji do fazy stałej (ang. Solid Phase Extraction, SPE) a następnie rozdzielom chromatograficznym przy wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [11]. Najbardziej powszechne metody stosowane do badań steroidów stanowią chromatografia gazowa (GC) oraz chromatografia cieczowa (LC) połączona z detektorem masowym (MS).

Bardzo często celem badań wykrywających obecność hormonów steroidowych u mięczaków jest powiązanie ich roli z fizjologią rozrodu tych zwierząt. Dlatego też, we wielu publikacjach można znaleźć efekty przyczynowo - skutkowe, np. stężenie steroidów w tkankach zwierząt znacznie się różni w zależności od pory roku i np. najwyższe wartości hormonów stwierdza się okresie rozrodczym (w okresie tarła) [9,12,13]. Mięczaki morskie z łatwością pobierają związki lipofilowe z wody, w tym hormony steroidowe [14], stąd też stężenia tych związków w tkankach małży mogą zmieniać się sezonowo osiągając maksymalne stężenie wiosną i latem, a w tym czasie zachodzi również końcowa faza gametogenezy. Wzrost stężeń steroidów w wodzie w miesiącach ciepłych może być spowodowany zwiększoną aktywnością bakteryjną [15] czy produkcją metabolitów steroidów (np. glukuronidów czy siarczanów) przez kręgowce [16]. Dlatego też należy ostrożnie podchodzić do wyników dotyczących mięczaków, w których jednoznacznie stwierdza się korelację między wzrostem stężenia hormonów w ich tkankach a indukcją gametogenezy bez określenia aktywności enzymatycznych biorących udział w przemianach hormonalnych. Prace naukowe dotyczące występowania płciowych hormonów steroidowych: androgenów (głównie testosteronu) i estrogenów (głównie 17 β -estradiolu) u mięczaków bardzo często wskazują na różnice płciowe w stężeniach tych hormonów. Uważa się, że częściej większe stężenie testosteronu jest oznaczone u samców niż u samic [17,18]. Odwrotnie, jeżeli chodzi o estradiol – tutaj znacznie większa ilość jest wykrywana w tkankach samic [17,19]. Można również znaleźć dane, gdzie stwierdza się brak różnic w stężeniach androgenów i estrogenów między samcami i samicami [20]. Kolejnym argumentem wskazującym na udział płciowych hormonów steroidowych w rozmnażaniu mięczaków jest wyższe stężenie tych steroidów w tkankach rozrodczych zwierząt. W pracy Lu i innych [21] wykazano pięć razy wyższe stężenia T i E2 w gonadach *Thais clavigera* niż w pozostałych tkankach [21]. U omułka stwierdzono nawet 18- i 91-krotnie wyższe stężenia T i E2 w gonadach w porównaniu do innych tkanek [22]. Tak wysokie stężenia hormonów płciowych w

tkankach rozrodczych nie muszą jednak oznaczać, że gonady syntetyzują steroidy. Może być to po prostu wynik akumulacji androgenów i estrogenów w tkance bogatej w białko (w tym w receptory wychytujące steroidy) i tłuszcze (umożliwiające np. estryfikację wolnych steroidów).

Najważniejszym pytaniem, jakie stawiają sobie badacze zajmujący się tematyką hormonów steroidowych u mięczaków jest – skąd biorą się steroidy w tkankach tych zwierząt? Czy bezkręgowce na równi z kręgowcami prowadzą syntezę steroidów, angażując wiele szlaków metabolicznych i aktywności enzymatycznych w tych procesach? Czy raczej akumulują potrzebne steroidy ze środowiska zewnętrznego, w przypadku bezkręgowców morskich – z mórz i oceanów? Przeanalizowane literaturowe dane wskazują na udział obu tych procesów w pozyskiwaniu steroidów. Jednak zwolennicy teorii aktywnego pobierania przez mięczaki hormonów ze środowiska często wykluczają ich zdolność do biosyntezy steroidów. Dzieje się tak, ponieważ nie został dotychczas przedstawiony szlak syntezy tych związków uwzględniający obecność wszystkich aktywności enzymatycznych [4,5].

Prekursorem hormonów steroidowych jest cholesterol, którego obecność została potwierdzona w tkankach mięczaków [23]. Uważa się, że sposób uzyskania tego steroidu przez bezkręgowce ma związek ze sposobem odżywiania. Gatunki mięsożerne (drapieżne) jak ślimaki morskie *Buccinum undatum* [24] i mątwy *Sepia officinalis* [6] pozyskują cholesterol z diety, natomiast gatunki roślinożerne jak ślimaki *Patella caerulea*, *Monodonta turbinata* [25] czy *Arion rufus* [26] same syntetyzują ten związek. Cholesterol, aby stać się źródłem płciowych hormonów steroidowych musi zostać przekształcony do pregnenolonu. U kręgowców aktywność desmolazy cholesterolowej (CYP11A) jest obecna w mitochondriach i powstający pregnenolon przemieszcza się do retikulum endoplazmatycznego, gdzie zachodzi jego konwersja do progesteronu. U bezkręgowców nie potwierdzono dotychczas obecności desmolazy cholesterolowej, co nie oznacza, że jej nie ma, ale może to wynikać z trudności metodycznej w oznaczeniu tej aktywności. W kolejnych przekształceniach progesteronu w szlaku prowadzącym do syntezy androgenów, u kręgowców wykorzystywane są aktywności dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowej (3 β -HSD) oraz enzymu o aktywności 17 α -hydroksylazy/17,20-liazy (CYP17). W tkankach mięczaków wykazano obecność 3 β -HSD o niskiej aktywności: na granicy detekcji [27,28] do maksymalnie 15% konwersji substratu u gatunku *Lymnaea stagnalis* [29], jednak obecność tego enzymu wykrywano metodą histochemiczną, używając przeciwciał dedykowanym białkom kręgowców [30], co budzi wątpliwości interpretacyjne, czy faktycznie dokonano oznaczenia właściwego enzymu. Pregnenolon i progesteron, będzie dalej transformowany przy udziale enzymu o aktywności 17 α -hydroksylazy/17,20-liazy. Mimo stwierdzenia obecności produktów tej reakcji enzymatycznej u bezkręgowców: dehydroepiandrosteronu (DHEA) czy androstendionu (Ad) nie wykrywa się obecności enzymów odpowiedzialnych za tę konwersję, lub jej aktywności enzymatyczne są na niskim poziomie, np. u gatunku *Sepia officinalis* oceniono wydajność tej konwersji na 10% powstałego DHEA z pregnenolonu i 4% z 17 α -hydroksyprenenolonu [6]. Kolejnym etapem syntezy androgenów jest przekształcenie androstendionu do testosteronu i u kręgowców odpowiada za to enzym dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowa (17 β -HSD). W przeciwieństwie do wyżej opisanych niskich aktywności enzymów biorących udział w steroidogenezie, wysoka aktywność 17 β -HSD w tkankach mięczaków została opisana w ponad 13 pracach naukowych [4]. Jednak enzym ten może wykazywać różne preferencje substratowe, ponieważ katalizuje redukcję 17-ketosteroidów oraz dehydrogenację 17 β -hydroksysteroidów więc jego udział w procesie steroidogenezy mięczaków może mieć charakter dodatkowy (nie musi być dominującą aktywnością). Poza tym 17 β -HSD bierze udział również w konwersji estrogenów (estronu w 17 β -estradiol).

W badaniach nad steroidogenezą mięczaków wyraźnie widać trend, aby oznaczać głównie testosteron jako dominujący androgen, wiążąc go równocześnie z funkcją rozrodczą (np. wykazując jego wysokie stężenia u samców różnych gatunków). Niewiele prac opisuje drogę konwersji testosteronu do dihydrotestosteronu (a DHT jest aktywną formą tego hormonu, zwłaszcza u ludzi). Aby powstał DHT potrzebna jest aktywność 5 α -reduktazy. W tkankach mięczaków stwierdza się obecność tego enzymu, ale ze względu na to, że 5 α -reduktaza należy do 3-okso-5 α -steroido 4-dehydrogenaz może również brać udział w innych szlakach metabolicznych np. w syntezie kwasów żółciowych, stąd też oznaczenie aktywności 5 α -reduktazy u mięczaków nie oznacza, że enzym ten bierze udział jedynie w procesie steroidogenezy. Dużą grupą hormonów steroidowych wykrywanych u mięczaków są estrogeny, z czego najwięcej prac dotyczy oznaczeń 17 β -estradiolu (E2). Podobnie jak w przypadku testosteronu, upatruje się rolę E2 w regulacji procesu rozrodczego tych bezkręgowców (podobnie jak u kręgowców). Do momentu ukazania się mojej publikacji (**H5**) jednoznacznie nie stwierdzono, aby estrogeny (E2, czy estron lub estriol) powstawały w wyniku syntezy w tkankach mięczaków. Enzymem, który katalizuje konwersję androgenów do estrogenów jest aromataza (u kręgowców oznaczana jako CYP19A). U bezkręgowców oznacza się niską aktywność aromatazy, określając jej wartości konwersji androgenów do estrogenów od 0,01% [31], do 3% [6]. Le Curieux-Belfond i inni, opisał u ostryg *Crassostrea gigas* nietypową konwersję androstendionu do estriolu (zamiast estronu) [32]. W związku z tym, (do czasu opublikowania moich badań) utrzymywano, że mięczaki nie prowadzą biosyntezy estrogenów, co było głównym argumentem potwierdzającym tezę, że hormony takie jak 17 β -estradiol, estron czy estriol są wychwytywane przez te zwierzęta ze środowiska.

Zwolennicy teorii pobierania przez mięczaki związków steroidowych ze środowiska przekonują, że środowisko życia zarówno mięczaków lądowych jak i morskich obfituje w steroidy i związki te mogą się dostać do organizmów zwierząt wraz z wodą lub żywnością. Bezkręgowce morskie są narażone na wysokie stężenia hormonów steroidowych ze względu na presję antropogeniczną. Hormony i ksenohormony (np. 17 α -etynyloestradiol, 4-nonylofenol czy bisfenol A) dostają się do morza na skutek odprowadzania wód z oczyszczalni ścieków [33] i ścieków z gospodarstw rolnych [34]. Poza tym, źródłem hormonów mogą być kręgowce, które wydalają steroidy z moczem i kałem w formie sprzęgniętej z endogennymi substratami, np. u ryb obserwuje się usuwanie steroidów również przez skrzelę [16]. Mimo, że steroidy są wydalane przez kręgowce w postaci głównie nieaktywnych glukuronidów lub siarczanów (jako produkty II fazy detoksykacji), pobrane przez mięczaki mogą być przez nie enzymatycznie metabolizowane do „wolnych” (niesprzężonych) związków. Tkanki mięczaków są nawet wykorzystywane do izolacji enzymów trawiących koniugaty steroidów; dostępne komercyjnie preparaty o aktywności β -glukuronidazy i sulfatazy z *Helix pomatia* czy *Patella vulgata* (firmy Merck) są stosowane do hydrolizy i ekstrakcji wolnych steroidów z tkanek kręgowców.

Inną grupą organizmów „produkujących” steroidy w środowisku morskim są bakterie. Jedne gatunki, pochodzące najczęściej z wód ściekowych, przekształcają sprzężone koniugaty w wolne, biologicznie czynne steroidy [35]. Aktywność β -D-glukuronidazy jest obecna u wielu gatunków bakterii, takich jak *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Yersinia sp.* i w wielu innych [36]. Inne bakterie mogą same syntetyzować steroidy; np. obecne w osadach beztlenowe bakterie *Steroidobacter denitrificans* czy *Sterolibacterium denitrificans* posiadające aktywność hydratazy/dehydrogenazy testosteronu (gen *AtcABC*) mają zdolność syntezy estrogenów z testosteronu [37–39].

Badania, które przeprowadziłam w tematyce hormonów steroidowych u bezkręgowców morskich wskazują, że małże z gatunku *Mytilus trossulus* pozyskują steroidy na oba sposoby. Potrafią

je pobierać ze środowiska, w okresie dużej dostępności steroidów, np. latem. Prowadzą również syntezę hormonów, w warunkach niedostatku, np. wczesną wiosną (po okresie zimowym związanym z hibernacją i wykorzystaniem endogennych substancji).

Wiele badań eksperymentalnych z wykorzystaniem mięczaków wykazało, że zwierzęta te mają zdolność biomagnifikacji związków o budowie steroidowej. Najczęściej badane steroidy, testosteron i 17 β -estradiol utrzymują się w tkankach tych bezkręgowców głównie w postaci zestryfikowanej [40]. Ekspozycja małży na estrogeny (np. E2) skutkuje ich bioakumulacją w tkankach oraz wzmożoną estryfikacją, np. u *Mytilus edulis* ilość estrów estrogenowych jest średnio 10 razy większa niż wolnego 17 β -estradiolu [41], a u osobników z gatunku *Dreissena polymorpha* poddanych ekspozycji na ¹⁴C-E2, wyższy poziom zestryfikowanego 17 β -estradiolu utrzymywał się ponad 10 dni po zakończonym eksperymencie [42]. Biomagnifikacji w tkankach mięczaków mogą ulegać też ksenohormony, np. etynyloestradiol EE2, syntetyczny estrogen pochodzący z zanieczyszczeń wód jako składnik środków antykoncepcyjnych. Wykazano, że mięczaki z gatunku *Haliotis diversicolor supertexta* (Zatoka Dapeng – Chiny) pobierają ze środowiska i kumulują EE2 w stężeniach nanogramowych (80 -130 ng/gram suchej masy) [43].

Estrogeny kręgowców działają na komórki docelowe poprzez receptory estrogenowe (ER), należące do rodziny receptorów jądrowych. Receptory te pełnią rolę czynników transkrypcyjnych wpływających na ekspresję określonych genów. W tkankach mięczaków opisuje się białka funkcjonalnie podobne do receptorów estrogenowych, „nER-like proteins” [44,45], jednak, mimo możliwości wiązania estrogenów zachowują się one jak receptory konstytutywne. Oznacza to, że 17 β -estradiol nie jest głównym ligandem receptorów nER, mogą być nimi również endogenne metabolity czy egzogenne ksenobiotyki [46,47]. U kręgowców steroidy mogą również wchodzić w interakcję z receptorami błonowymi, prawdopodobnie o budowie charakterystycznej dla receptorów związanych z białkami G. Mechanizm tego typu oddziaływań rozpoczyna się z chwilą związania steroidu z receptorem błonowym, zapoczątkowując wewnątrzkomórkową kaskadę sygnalizacyjną, regulującą wiele szlaków metabolicznych [48]. Dodatkowo steroidowe receptory błonowe są zaangażowane w regulację jonowych kanałów błonowych, kinaz tyrozynowych oraz kinaz aktywowanych mitogenami. U mięczaków wykryto obecność trzech receptorów błonowych wiążących steroidy. Są to: receptor progestynowy mPR (obecny w pięciu izoformach), receptor wiążący progesteron oznaczony jako PGMRC oraz błonowy receptor estrogenu (określany jako GPR30) [49–51]. Obecność tych receptorów w błonach świadczy o tym, że u mięczaków za pośrednictwem hormonów steroidowych może odbywać się aktywacja i regulacja wielu ścieżek sygnalizacyjnych. Dotychczas nie wykryto u mięczaków receptorów androgenowych (AR) i wydaje się, że androgeny łączą się raczej z receptorami SXR/RXR (ang. steroid and xenobiotic receptor/retinoid X receptor). Pomimo braku specyficznego AR w hemolimfie mięczaków występuje glikoproteina wiążąca hormony płciowe SHBG (ang. sex hormone binding globulin), która wiąże i transportuje zarówno androgeny jak i estrogeny [52]. Wydaje się, że właśnie to białko ma funkcję receptora androgenowego u mięczaków. Poza obecnością specyficznych białek wiążących steroidy w tej grupy bezkręgowców występuje również albumina, która może być również zaangażowana w wiązanie steroidów i transport w hemolimfie [53].

Publikacje, które zostały przeze mnie włączone do rozprawy habilitacyjnej przedstawiają dowody na obecność naturalnych (takich jak testosteron, 17 β -estradiol, estron i estriol) i syntetycznych (17 α -etynyloestradiol) płciowych hormonów steroidowych w tkankach małży z gatunku *Mytilus trossulus* z Zatoki Gdańskiej. Opisałam różnice w stężeniach tych hormonów w zależności od tkanki w której były

oznaczane: potencjalnie steroidogenne gonady i niesteroidogenne skrzela, w zależności od płci; samce i samice a także w odniesieniu do zmienności sezonowej (pory roku) i przestrzennej (punkty poboru różniące się głębokością czy też odległością od źródła zanieczyszczeń). Wykazałam również, że małże morskie mogą zarówno pobierać ze środowiska jak i syntetyzować estrogeny, przy czym dużą rolę w tych procesach odgrywa temperatura. W badaniach dotyczących wpływu EDs (ang. Endocrine Disruptors) na fizjologię rozrodu małży, wykazałam również występowanie zaburzeń w budowie i funkcjonowaniu gonad *M. trossulus* po ekspozycji na ksenoestrogen - 17 α -etynyloestradiol.

Szczegółowe cele badań umożliwiające opracowanie osiągnięcia habilitacyjnego uwzględniają:

- I. Opracowanie metody oznaczania hormonów steroidowych w tkankach miękkich małży w oparciu o technikę chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS) wraz z optymalizacją procedury ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej.

H2. Anna Hallmann*, Katarzyna Smolarz, Lucyna Konieczna, Sandra Zabrzeńska, Mariusz Belka, Tomasz Bączek, 2016, LC-MS measurment of free steroids in mussels (*Mytilus trossulus*) from the southern Baltic Sea, J. Pharm. Biomed. Anal., 117, 311-315, IF:3,25 (MNI_{SW}=35)

Pierwsze badania, które zostały przeprowadzone na tkankach małży z gatunku *Mytilus trossulus*, dotyczyły opracowania metody oznaczania wolnych steroidów wraz z optymalizacją procedury ekstrakcji. Osobniki zostały zebrane w 2012 roku z trzech punktów poboru leżących w Zatoce Gdańskiej; punktu I – określonego jako stacja referencyjna (wolna od potencjalnych zanieczyszczeń, N: 54° 40' 00", E: 18° 33' 55" z głębokości 7 metrów), II i III – miejsca leżące w okolicach ujścia wód z oczyszczalni ścieków Dębogórze (II - N: 54° 36' 80" E: 18° 34' 40" z głębokości 14 metrów, III - N: 54° 35' 98" E: 18° 32' 83" głębokość 9 m). Małże zostały przetransportowane do laboratorium, gdzie poddano je sekcji. Osobno pobierano skrzela i gonady, pulowano je do ilości 1 grama mokrej tkanki a następnie zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze: -80°C. Pierwszy etap ekstrakcji polegał na enzymatycznej hydrolizie tkanki z użyciem subtylizyny (z *Bacillus licheniformis*) – enzymu hydrolizującego wiązania peptydowe i estrowe. Wiedząc, że mięczaki charakteryzują się wysokim poziomem zestryfikowanych steroidów, przeprowadzanie etapu hydrolizy tkanek było niezbędne do uwolnienia hormonów steroidowych z ich estrów. Kolejnym etapem mojej pracy było przeprowadzenie ekstrakcji do fazy stałej (ang. solid phase extraction, SPE) z zastosowaniem różnych rozpuszczalników eluujących. Ekstrakcja do fazy stałej w przypadku analitów o właściwościach niepolarnych, jakimi są związki o budowie steroidowej, z matrycy stałej, jaką jest tkanka miękka pozwala na zastosowanie metanolu jako rozpuszczalnika wyciągającego anality ze złoża. Technika SPE pozwala również na zatężenie próbki i w konsekwencji możliwość uzyskania niższej granicy oznaczalności, co jest bardzo istotne zwłaszcza w odniesieniu do badanych próbek bezkręgowców. Po godzinnym trawieniu, na każdy gram tkanki umieszczony w 1 ml 0,4% roztworu subtylizyny dodawano 5 ml metanolu i wytrząsano przez minutę. Otrzymaną zawiesinę wirowano przy 2800 x g w czasie 10 min. Uzyskany supernatant przemywano 1 ml heksanu i po kolejnym odwirowaniu usuwano frakcję zawierającą heksan ze związanymi kwasami tłuszczowymi. Po odwirowaniu, do wszystkich próbek dodano 5 ml wody destylowanej celem ich rozcieńczenia. Tak przygotowane preparaty naniesiono na kolumny SPE z wypełnieniem hydrofilowo-lipofilowym HLB (ang. hydrophilic-lipophilic balance). Celem ekstrakcji SPE jest wyizolowanie analitów z matrycy w czystej i skoncentrowanej postaci, a zastosowanie takiego sorbentu jak kopolimer diwinylobenzenu i winylopirolidonu (HLB), który charakteryzuje się dużą powierzchnią aktywną, jest dobrym wyborem do ekstrakcji analitów o

różniących się właściwościami hydrofobowymi [54]. Kolumnienki były wcześniej kondycjonowane dwukrotnie za pomocą 5 ml metanolu i 5 ml wody. Następnym etapem było przemycie złoża z użyciem 5 ml wody destylowanej, 5 ml mieszaniny wody i acetonu (80:20, v/v) oraz 5 ml heksanu celem pozbycia się ewentualnych zanieczyszczeń. Po etapie suszenia złoża anality eluowano z użyciem 2 ml metanolu. Odparowanie metanolu przeprowadzono w atmosferze azotu w temperaturze 45°C, aby zapobiec utlenieniu czy degradacji analitów. Sucha pozostałość została rozpuszczona w 100 µl mieszaniny metanol – woda (65:35, v/v). Próbkę po odwirowaniu 10 000 obrotów/min w czasie 8 min poddano analizie chromatograficznej z wykorzystaniem techniki LC-MS. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono przy użyciu kolumny Poroshell 120 EC-C18 (100 × 3,0 mm; 2,7 µm). Detekcja steroidów zachodziła w trybie jonizacji dodatniej za pomocą spektrometru masowego z pojedynczym kwadrupolowym analizatorem mas Agilent 6120. Źródłem jonizacji było elektrorozpylanie (ESI) a uzyskane wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania ChemStation.

Zastosowanie wyżej opisanej metody trawienia tkanek małży i ekstrakcji steroidów okazało się być optymalne do uzyskania wartości stężeń hormonów steroidowych mięczaków w zakresie opisywanym w literaturze. Po przeprowadzeniu analizy wyników (w tym statystycznej – testem Kruskala Wallisa ANOVA i testem Wicoxona ANOVA) stwierdziłam, że najwyższe stężenia naturalnych hormonów steroidowych zostały znalezione w tkankach zwierząt, które zasiedlają środowisko referencyjne (z dala od potencjalnych zanieczyszczeń). Małże charakteryzowały się stężeniem testosteronu na poziomie T = 13,4 ng/gram mokrej masy (mokra masa = m.m.) w skrzelach i T = 13,6 ng/g m.m. w gonadach. Stężenie 17β-estradiolu było niższe: E2 = 9 ng/g m.m. w skrzelach i E2 = 6,9 ng/g m.m. w gonadach. Nie zanotowano różnic w ilości estronu między tkankami małży (średnio 3,5 ng/g w.w.) oraz w ilości estriolu (średnia wartość to E3 = 1,8 ng/g m.m.). W porównaniu do stężeń naturalnych hormonów steroidowych zmierzonych u małży z punktu I, w tkankach małży z punktu II i III te stężenia były dużo niższe. Zaobserwowano prawie 10-krotnie mniej E2 zarówno w skrzelach jak i w gonadach, 7-krotnie mniej E1 (poza tkanką skrzeli małży z punktu II), trzykrotnie mniej było również testosteronu i estriolu. Ponadto w tkankach osobników *M. trossulus* zebranych z punktów II i III stwierdzono obecność syntetycznego estrogenu, 17α-etyniolestradiolu w stężeniach w okolicy 1 ng/g m.m. Uzyskane przeze mnie wyniki prezentują pierwsze w literaturze dane dotyczące określenia ilości naturalnych i syntetycznych płciowych hormonów steroidowych w tkankach małży z gatunku *M. trossulus* z rejonu południowego Bałtyku. Opublikowane wyniki wskazują jednoznacznie na różnice w zawartości steroidów w organizmach mięczaków morskich związane z miejscem ich osiedlenia; małże bytujące w okolicach bliskich odprowadzeniu wód z oczyszczalni ścieków Dębogórze (ujście wód do Zatoki Gdańskiej we wsi Mechelinki) mają znacznie niższe stężenia naturalnych hormonów steroidowych. Dodatkowo, w tkankach tych zwierząt stwierdza się obecność ksenoestrogenu jakim jest 17α-etyniolestradiol. Może to oznaczać, że wody ściekowe oczyszczone przez system oczyszczalni ścieków i odprowadzone do morza, zawierają związki chemiczne typu EE2, który ulega kumulacji w tkankach małży.

- II. Oznaczenie stężenia płciowych hormonów steroidowych w tkankach bałtyckich małży *M. trossulus* z uwzględnieniem różnic w stężeniach tych steroidów wynikających z rodzaju tkanki (skrzela i gonady), płci (samce i samice), do zmienności sezonowej (pory roku) i przestrzennej (zróżnicowana głębokość czy ekspozycja na zanieczyszczenia) oraz stadium gametogenezy.

H1. Sandra Zabrzeńska, Katarzyna Smolarz, **Anna Hallmann**, Lucyna Konieczna, Tomasz Bączek, Maciej Wołowicz, 2015, Sex-related differences in steroid concentrations in the blue mussel (*Mytilus edulis trossulus*) from the southern Baltic Sea, Comp. Biochem. Physiol. A., 183, 14-19, IF:2,04 (MNI_{SW}=25)

H4. Katarzyna Smolarz, Sandra Zabrzeńska, Lucyna Konieczna, **Anna Hallmann***, 2018, Changes in steroid profiles of the blue mussel *Mytilus trossulus* as a function of season, stage of gametogenesis, sex, tissue and mussel bed depth, Gen. Comp. Endocrinol., 259, 231-239, IF:2,56 (MNI_{SW}=25)

Kolejne badania, które zostały przeprowadzone na gatunku *M. trossulus* – bałtyckiego małża południowego Bałtyku, dotyczyły wieloczynnikowej analizy przyczyn zmienności zawartości płciowych hormonów steroidowych. Małże pobierano sezonowo z punktów różniących się głębokością, znajdujących się w Zatoce Gdańskiej, z dala od potencjalnych źródeł zanieczyszczeń (REF – 10 metrów głębokości, GN – 20 metrów głębokości). Po przetransportowaniu do laboratorium, zwierzęta poddano sekcji oraz określono ich płeć przygotowując rozmazy tkanki gonad na szkiełku mikroskopowym w roztworze soli fizjologicznej. Każdy osobnik został również przeanalizowany pod kątem oceny dojrzałości gonad w oparciu o pięciostopniową skalę wg Wenne [55], gdzie 1 - regeneracja gonad po ostatnim tarle, 2 - aktywna gametogeneza z trwającym podziałem komórek i niedojrzałymi komórkami zarodkowymi w pęcherzykach gonadalnych, 3 – dojrzałość (dojrzewanie oocytów - witelogeneza i plemników - spermiogeneza), 4 – tarło (uwalnianie gamet), 5 - stadium spoczynkowe, regeneracja. Indeks gonad (GI) reprezentujący dojrzałość gonad oceniono i obliczono w oparciu o formułę:

$GI = [n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 2 + n_3 \cdot 3 + n_4 \cdot 4 + n_5 \cdot 5] / N$, gdzie „n” – ilość osobników w każdym ze stadium rozwoju gonad zaś „N” – całkowita ilość osobników

Następnie, osobno pobierano skrzela i gonady od samców i samic, pulowano je do ilości 1 grama mokrej tkanki, zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C. Trawienie tkanek, ekstrakcja wolnych steroidów do fazy SPE oraz oznaczenie ilości płciowych hormonów steroidowych w tkankach omułek techniką LC-MS została przeprowadzona według metody opisanej w pracy **H2**.

Analiza danych wykazała, że najwyższe stężenia płciowych hormonów steroidowych stwierdzono w tkankach małży wiosną i latem. Latem 2012 roku odnotowano najwyższe stężenie testosteronu zarówno u samców (9,82 ng/g m.m.) jak i u samic (5,69 ng/g m.m.). Z grupy estrogenów, latem stwierdzono najwyższy poziom 17β-estradiolu w tkankach omułka: 7,37 ng/g m.m. u samic i 5,58 ng/g m.m. u samców. Stężenie estronu (E1) utrzymywało się na podobnym poziomie u samic i samców: 2,63 ng/g m.m. i 2,51 ng/g m.m. odpowiednio. Ilość estriolu była znacznie niższa od E2 i od E1, ale też najwyższa latem: w tkankach samców odnotowano 1,82 ng/g m.m. E3, zaś u samic – 1,11 ng/g m.m. E3. Wysokie stężenia steroidów korelowały z dojrzałością gonad, dla samców GI = 3 i dla samic GI = 2,8. Oznacza to, że dojrzałe płciowo osobniki charakteryzowały się najwyższymi stężeniami hormonów płciowych w swoich tkankach. U omułek złowionych jesienią 2012 roku poziom steroidów był niższy w porównaniu z wartościami tych związków oznaczonych latem. U samców ilość testosteronu spadła o 40% (5,95 ng/g m.m.), u samic ilość T zmniejszyła się o 10% (5,08 ng/g m.m.). Również jesienią odnotowano niższe stężenia 17β-estradiolu: u samic – 55% mniej E2 (3,36 ng/g m.m.), zaś u samców – 50% mniej E2 (2,87 ng/g m.m.). Stężenie estronu nie zmieniało się znacznie u samic – 2,49 ng/g m.m. i spadało u samców - 1,95 ng/g m.m.). Ilości estriolu w tkankach małży obniżały się jesienią do wartości poniżej 1 ng/g mokrej masy; u samic E3 oznaczono na poziomie 0,83 ng/g m.m. a u samców E3 wynosił 0,59 ng/g m.m. Obniżone stężenia hormonów w tkankach małży również korelowały ze zmianą stopnia dojrzałości gonad. Samce charakteryzowały się indeksem GI = 2 natomiast samice GI = 1,5, co oznacza,

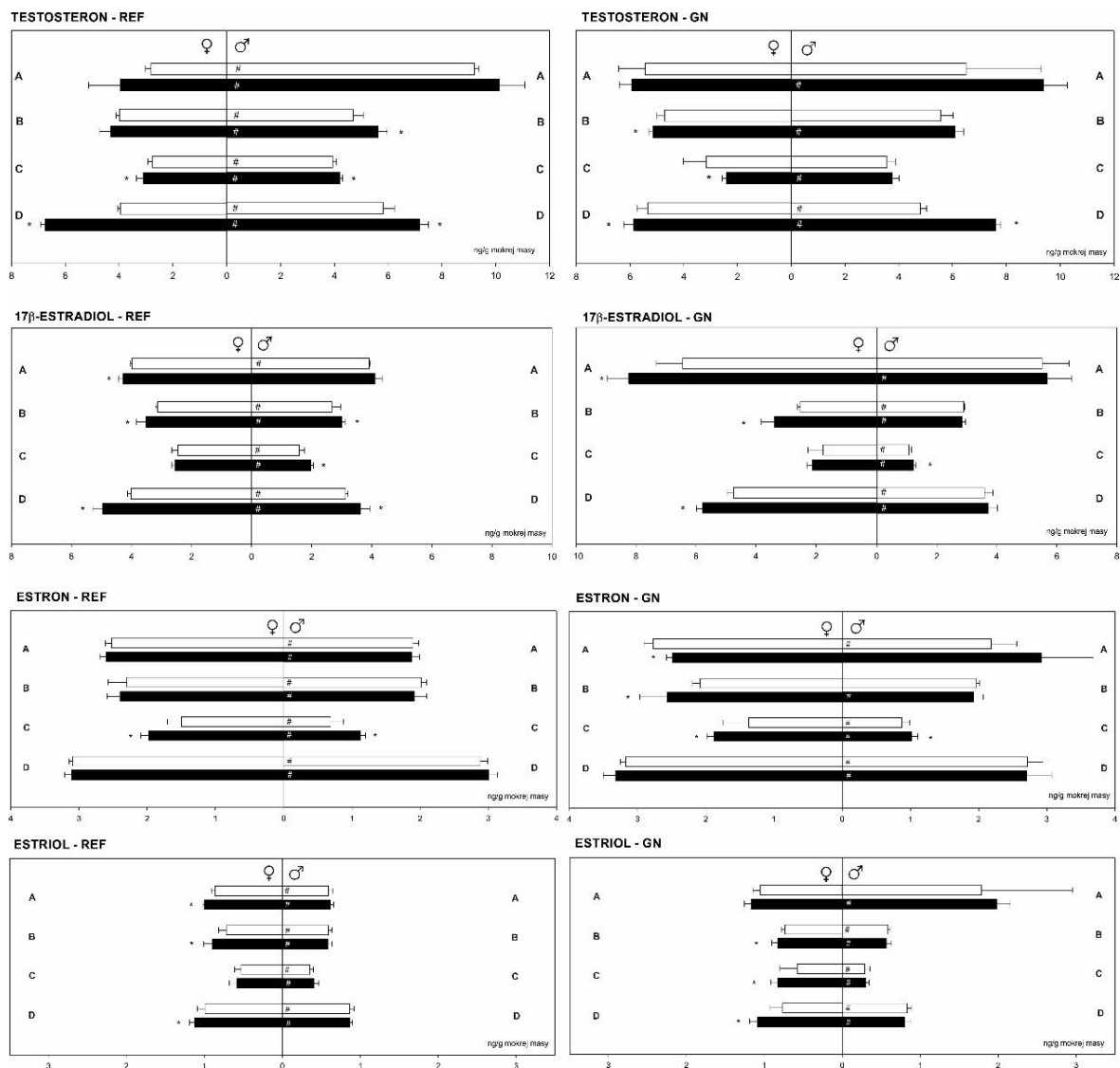
że mięczaki mimo przebytego tarła nie wchodziły w stadium spoczynkowe (GI = 5), lecz przygotowywały się do kolejnego rozrodu. Prawdopodobnie spadek stężenia steroidów wynikał z procesu tarła, kiedy wraz z uwolnionymi gametami usuwane są metabolity (w tym wypadku również steroidy). Zwierzęta poławiane w okresie zimy 2013 roku oznaczały się najniższymi stężeniami naturalnych płciowych steroidów. Stężenie testosteronu spadało o 60% u samców (w porównaniu do najwyższych wartości notowanych latem 2012) i wynosiło 3,66 ng/g m.m., zaś u samic ilość T spadła o 50% (2,79 ng/g m.m.). Ilość 17 β -estradiolu malała u samic o 70% do wartości 1,97 ng/g m.m., a u samców nawet o 80% (1,14 ng/g m.m.). U małży zebranych zimą stwierdzono znacznie mniej estronu i estriolu: w tkankach samic – 1,63 ng/g m.m. E1 i 0,56 ng/g m.m. E3 oraz 0,92 ng/g m.m. E1 i 0,30 ng/g m.m. E3 w tkankach samców. Małże, zarówno samce jak i samice, zebrane zimą charakteryzowały się indeksem GI=2 (aktywna gametogeneza). Nie odnotowano korelacji pomiędzy stopniem GI a ilością hormonów steroidowych w tkankach małży; w tkankach obniżało się znacznie stężenie steroidów mimo nie zmienionego stopnia GI. Omułki zebrane wiosną 2013, miały już wyższe stężenia steroidów w swoich tkankach. Zwiększyła się ilość testosteronu, u samców do ilości 6,49 ng/g m.m. zaś u samic do ilości 5,61 ng/g m.m. Wzrastała również ilość 17 β -estradiolu: do wartości 5,27 ng/g m.m. u samic i do wartości 3,65 ng/g m.m. u samców. W tkankach zwierząt „wiosennych” oznaczono najwyższe stężenia estronu: 3,25 ng/g m.m. E1 u samic i 2,94 ng/g m.m. E1 u samców. Stężenie estriolu wzrosło w tkankach samic do wartości 1,06 ng/g m.m. a w tkankach samców osiągnęło stężenie 0,86 ng/g m.m. Wzrost stężenia hormonów steroidowych w tkankach zwierząt korelował z zawansowaniem dojrzewania gonad, mianowicie GI zarówno dla samców i samic wynosił GI = 3, co oznacza, że małże osiągnęły gotowość rozrodczą.

Porównując zmienność przestrzenną wykazano, że w tkankach *M. trossulus* zebranych z punktu REF (z głębokości 10 metrów) w porównaniu do małży z punktu GN (20 metrów głębokości) występowały różnice w ilościach płciowych hormonów steroidowych. U samic bytujących na większej głębokości (GN) stężenia testosteronu i 17 β -estradiolu były wyższe niż u tych z płytszych rejonów, natomiast u samców wyższe stężenia testosteronu były w tkankach małży z punktu płytszego. Jednocześnie samce poławiane z głębszego stanowiska (GN) miały w tkankach więcej E2. Może to wynikać z faktu, iż samce zasiedlające płycej położony punkt szybciej są gotowe do rozrodu - co wskazuje na udział temperatury (wyższa w punkcie REF) w procesie gametogenezy. Stężenia pozostałych estrogenów (E1 i E3) nie różniły się znacząco w tkankach małży z punktu GN i REF. Różnica dotyczyła jedynie sezonu letniego, gdzie w tkankach samców zebranych z punktu GN oznaczono wyższe stężenia tych estrogenów.

Stężenia płciowych hormonów steroidowych były mierzone w dwóch tkankach małży: w skrzelach i gonadach. Wybrano je z uwagi na procentowy udział masy/powierzchni w całym osobniku – zarówno skrzela jak i gonady (zwłaszcza w stadium GI = 3) są dominującą tkanką. Poza tym tkanki te pełnią różne funkcje fizjologiczne; skrzela filtrując wodę dostarczają do organizmu substancje egzogenne natomiast gonady uczestniczą w rozmnażaniu, więc upatruje się ich rolę w procesie steroidogenezy i jako „magazyn” steroidów. Analiza stężeń steroidów wykazała, że wyższe stężenia testosteronu i estrogenów znajdują się w skrzelach zarówno samców jak i samic. Wykazany trend utrzymywał się sezonowo (wiosną, latem, jesienią i zimą) i przestrzennie (na głębokości 10 metrów – REF i 20 metrów – GN) – Ryc. 1

Podsumowując uzyskane wyniki z prac **H1** i **H4**, stwierdzam, że sezonowe zmiany poziomu steroidów w tkankach *M. trossulus* nie przekładają się jednoznacznie na stopień dojrzewania gonad

małży. Poza tym, wyższe stężenia hormonów steroidowych zmierzono w skrzelach a nie w gonadach. Uzyskane wyniki mogą jednak sugerować, iż steroidy, mimo, że nie biorą udziału w całym cyklu reprodukcyjnym małży, mogą inicjować zapoczątkowanie ostatniej fazy (GI = 4) cyklu u obu płci. Większa zawartość hormonów w skrzelach mięczaków może również świadczyć o tym, że małże pobierają je z wody, a wzrost ilości androgenu i estrogenów latem może sugerować, że w środowisku zwiększa się dostępność egzogennych steroidów.



Rycina 1. Stężenie testosteronu, 17β-estradiolu, estronu i estriolu w gonadach (białe kolumny) i w skrzelach (czarne kolumny) samców i samic *M. trochus* poławianych z dwóch miejsc Zatoki Gdańskiej (REF i GN) w lipcu 2012 (A), listopadzie 2012 (B), lutym 2013 (C) i maju 2013 (D). Wartości przedstawiają średnie \pm SD (n = 10). Różnice płciowe (#p < 0,05) i tkankowe (*p < 0,05) zweryfikowano testem U-Mann-Whitney (ANOVA).

- III. Weryfikacja hipotezy, iż małże z gatunku *M. trossulus* mogą zarówno pobierać ze środowiska jak i syntetyzować estrogeny. Wykazanie obecności enzymu/kompleksu enzymatycznego przeprowadzającego proces aromatyzacji androgenów przez mitochondria i mikrosomy izolowane z tkanek małży (badania *in vitro*). Oznaczenie w tkankach zwierząt znakowanych izotopowo androgenów i wytworzonych z nich estrogenów (badania *in vivo*).

H5. Anna Hallmann, Lucyna Konieczna, Justyna Świeżak, Ryszard Milczarek, Katarzyna Smolarz, 2019, Aromatisation of steroids in the bivalve *Mytilus trossulus*, PEER Journal, [10.7717/peerj.6953](https://doi.org/10.7717/peerj.6953) IF: 2,1 (MNI_{SW}=35)

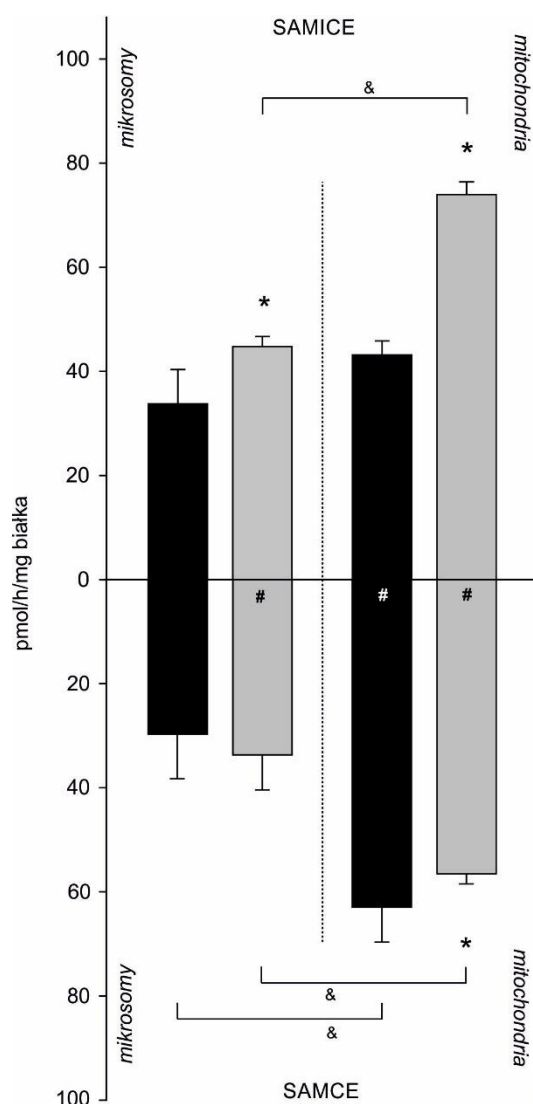
Wyniki opisane w publikacjach **H1** i **H4** wyraźnie wskazały na sezonowe zmiany stężeń płciowych hormonów steroidowych w skrzelach i gonadach *M. trossulus*. Najwyższe stężenia testosteronu i 17 β -estradiolu stwierdzono w tkankach małży wiosną i latem, najniższe jesienią i zimą. W związku z tym, postawiłam hipotezę, że istnieje mechanizm regulujący ilość hormonów w tkankach; w zależności od pory roku i dostępności steroidów w wodzie małże uruchamiają pobieranie tych związków ze środowiska (przy dużej dostępności – wiosną i latem) lub same syntetyzują (gdy obniża się zawartość steroidów w tkankach, np. zimą). W tym celu przeprowadzono eksperymenty na izolowanych organellach – mitochondriach i mikrosomach ze skrzel i gonad małży, mające na celu wykazanie obecności enzymu (lub też kompleksu enzymatycznego) o aktywności „aromatazy” (białka o aktywności podobnej do aktywności aromatazy kręgowców, ang. aromatase-like) przeprowadzającego proces aromatyzacji androgenów – czyli biosyntezę estrogenów. Aby potwierdzić zdolność syntezy estrogenów przez małże, przeprowadzono eksperyment ekspozycyjny, gdzie inkubowano osobniki w obecności znakowanych izotopowo ¹³C-androgenów i szukano produktów tkankowej aromatyzacji – znakowanych ¹³C-estrogenów. Zaplanowane doświadczenia były rozłożone w czasie; zoptymalizowanie metody pomiaru aktywności „aromatazy” zajęło pięć lat (od 2012 do 2017 roku), eksperyment ekspozycyjny przeprowadzono wiosną 2018 roku. Małże były poławiane sezonowo z rejonu Zatoki Gdańskiej z punktu o współrzędnych N: 54° 40' 00" i E: 18° 33' 55" z głębokości 7 metrów. Przetransportowane do laboratorium mięczaki poddano sekcji, wyodrębniono z nich tkankę skrzel i gonad. U części osobników określono płeć. Z rozdzielonych tkanek (spulowanych z około 50 osobników) sporządzono homogenat a następnie metodą wirowań uzyskano frakcję mitochondrialną i mikrosomalną, wykorzystywaną do badań aromatyzacji androgenów *in vitro*. Istnieje właściwie tylko jedna metoda pomiaru aktywności aromatazy bazująca na wykorzystaniu przez ten enzym znakowanego izotopowo substratu, którym jest 1 β -³H androstendion. W wyniku reakcji katalizowanej przez aromatazę pierścień A androgenu staje się pierścieniem aromatycznym a z pozycji 1 zostaje usunięty proton, który zostanie włączony do powstającej wody. Dzięki zmierzeniu ilości powstającej ³H₂O wnioskujemy o działaniu aromatazy i możemy wyznaczyć jej aktywność. Mając doświadczenie w pomiarze aktywności CYP19A1 w komórkach ludzkich [56] postanowiłam zmierzyć aktywność tego enzymu u małży, bazując również na metodyce opisanej dla różnych gatunków mięczaków. Wykorzystując metodykę opisaną przez Lavado i innych [57] początkowo uzyskiwałam podobne wyniki aktywności rzędu od 1 do 3 pmol/h/mg białka mikrosomalnego. Opublikowanie prac przeglądowych przez Alexandra Scotta [4,5] chwilowo zatrzymały moje badania. A. Scott zakwestionował obecność i działanie enzymu określanego jako aromataza u bezkręgowców morskich. W kolejnym podejściu zmodyfikowałam jednak warunki temperaturowe, w jakich przeprowadzano reakcję aromatyzacji. Małże bałtyckie żyją w wodzie o temperaturze nie przekraczającej 15°C stopni w skali roku, postanowiłam obniżyć temperaturę inkubacji frakcji białkowych z substratem z 25°C do poniżej 15°C.

Po zakończeniu doświadczenia – po pomiarze ilości powstałej wody trytowanej, wartości uzyskanych wyników przeszły moje oczekiwania. Po raz pierwszy osiągnięto wartości aktywności „aromatazy” oscylujące w okolicy 40 pmol/h/mg białka. Kolejne doświadczenia miały na celu zoptymalizowanie (wybranie odpowiedniej temperatury i pH do prowadzenia reakcji) metody pomiaru aromatyzacji przez mikroosomy i mitochondria pochodzące z tkanek małży. Najbardziej wydajny proces aromatyzacji przez frakcje komórkowe, przebiegał w temperaturze od 8°C do 9°C w pH od 7,0 do pH 9,0. Następne doświadczenia przeprowadzono już w ustalonych warunkach: 8°C i pH 7,6. W 2012 roku przeprowadzono sezonowy pobór małży z Zatoki Gdańskiej. W wyizolowanych mikrosomach ze skrzeli i gonad zmierzono aktywność „aromatazy”. Najwyższą aktywność wykazano w tkankach zwierząt zebranych wiosną; w skrzelach aktywność ta wynosiła 31,75 pmol/h/mg białka a w gonadach 39,34 pmol/h/mg białka. W tkankach zwierząt pozyskanych latem i jesienią zanotowano niższą o ponad połowę aktywność „aromatazy” – w skrzelach wynosiła średnio 13,84 pmol/h/mg białka a w gonadach 15,29 pmol/h/mg białka. Najniższą aktywność „aromatazy” stwierdzono w skrzelach i gonadach omułków zebranych w sezonie zimowym: odpowiednio 3,17 pmol/h/mg białka i 1,84 pmol/h/mg białka. Do kolejnych eksperymentów wybierano wobec tego takie osobniki, u których stwierdzono wysoki stopień aromatyzacji – małże zebrane wiosną.

Wiosną 2016 roku omułki zostały odłowione w Zatoce Gdańskiej, podzielone na samce i samice i ze spulowanych tkanek (skrzeli i gonad) pozyskano frakcje mikrosomalne i mitochondrialne, które inkubowano z $1\beta\text{-}^3\text{H}$ androstendionem. Zanotowano różnice między aktywnością „aromatazy” w skrzelach i gonadach we frakcji mikrosomalnej u samic; w gonadach aktywność była o 25% wyższa. U samców nie stwierdzono różnic w aktywnościach we frakcji mikrosomów porównując skrzela i gonady. Zaobserwowano natomiast większą aktywność „aromatazy” w mitochondriach, w porównaniu do mikrosomów, izolowanych zarówno ze skrzeli jak i gonad u obu płci. U samic aktywność „aromatazy” była o 30% wyższa w mitochondriach skrzeli i o 65% wyższa w mitochondriach z gonad. U samców aktywność ta była wyższa dwukrotnie w mitochondriach skrzeli (w porównaniu do mikrosomów ze skrzeli) i prawie o 70% wyższa w mitochondriach uzyskanych z gonad, jednak porównując aktywności z mitochondriów skrzeli i gonad nie stwierdzono różnic. Uzyskane wyniki sugerują, że największą aktywność ma „aromataza” w tkance gonadalnej samic (Ryc. 2).

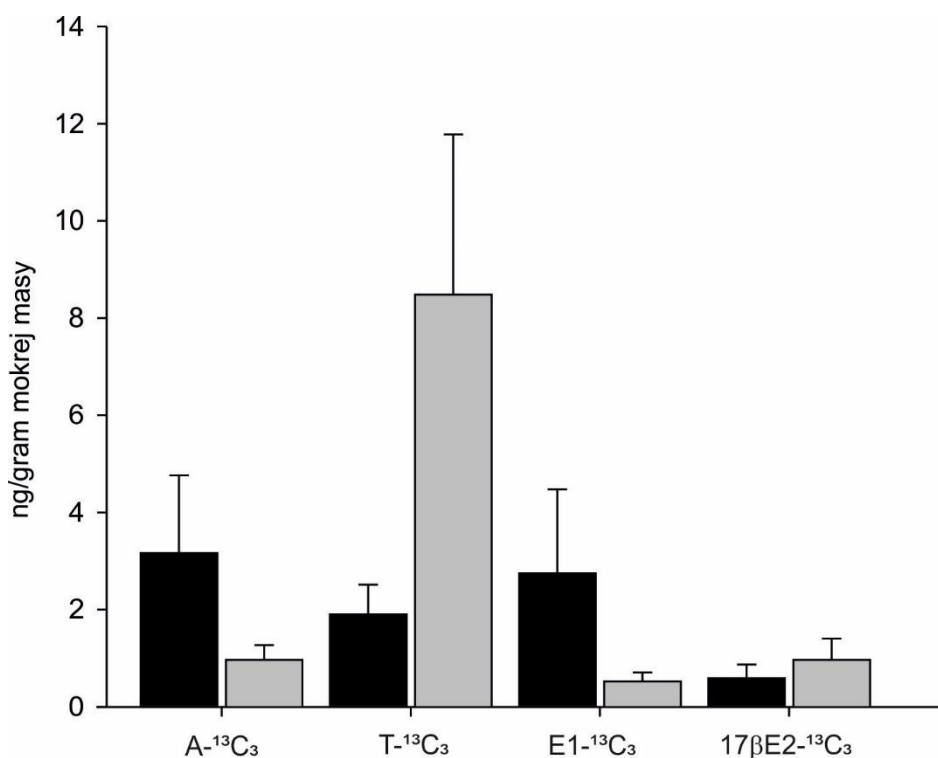
Aby ocenić, czy w tkankach omułków jest obecne białko o budowie podobnej do ssacej (lub ludzkiej) funkcjonujące jako aromataza, postanowiłam zastosować inhibitory aromatazy ludzkiej, wykorzystywane jako leki przeciwnowotworowe (np. w leczeniu raka piersi). Wybrałam letrozol i anastrozol – wyjątkowo selektywne inhibitory działające w stężeniach nanomolowych [58–60] oraz ketokonazol, który ma szerokie spektrum inhibicji: uczestniczy w hamowaniu różnych szlaków syntezy steroidów, w tym syntezę ergosterolu (jako lek przeciwgrzybiczny) [61–63]. W celu oceny działania wybranych inhibitorów do kolejnych eksperymentów wybrałam mikroosomy wyizolowane z gonad omułków, które charakteryzowały się wysoką aktywnością aromatazy. Frakcje te inkubowano przez 1 h w obecności trzech inhibitorów o różnym stężeniu: letrozolu, anastrozolu i ketokonazolu. W obecności letrozolu stwierdzono wzrost aktywności „aromatazy” w gonadach; ponad dwukrotny – przy stężeniu 1mM letrozolu. Również w obecności anastrozolu widoczny był wzrost aktywności „aromatazy” w mikrosomach izolowanych z gonad małży, prawie 40% przy stężeniu 0,5 mM, natomiast hamujący efekt uzyskano dopiero przy stężeniu 1mM anastrozolu – aktywność „aromatazy” spadła o 50%. Z kolei, po zastosowaniu ketokonazolu zaobserwowano hamujący efekt aktywności „aromatazy” wraz ze wzrastającym stężeniem ketokonazolu – 50% przy stężeniu 0,5 mM. Podsumowując wpływ związków o charakterze inhibitorów aromatazy *in vitro* na mikroosomy z gonad omułka, można

przypuszczać, że, będąc niewrażliwe na wysokie stężenia selektywnych inhibitorów, białko enzymatyczne o funkcji „aromatazy” znacznie różni się budową od formy znanej u ssaków. Jedynie ketokonazol wykazał zależne od stężenia działanie hamujące proces metabolizowania substratu. Ketokonazol ma jednak szersze spektrum działania na metabolizm steroidów, może wpływać hamująco na wiele enzymów należących do cytochromów P450. Wydaje się więc wysoce prawdopodobne, że proces aromatyzacji, bardzo wydajny w obecności zarówno białek mikrosomalnych i mitochondrialnych, zachodzi przy udziale białka z rodziny cytochromów P450. Jednak proces prowadzenia „aromatyzacji” androgenów nie musi być jego jedyną funkcją, może być to jeden ze sposobów na detoksykację endogennych lub egzogennych metabolitów.



Rycina 2. Aktywność aromatazy w mikrosomach i mitochondriach izolowanych ze skrzel (czarne kolumny) i gonad (szare kolumny) samców i samic *M. trussulus*. Wartości przedstawiają średnie \pm SD (n = 3); różnice tkankowe (*p < 0,05), płciowe (#p < 0,05) i między mikrosomami a mitochondriami (&p < 0,05) zweryfikowano testem Kruskala-Wallis (ANOVA).

Od 2012 roku, od kiedy zajęłam się badaniem aromatazy w tkankach małży, zamierzałam przeprowadzić eksperyment *in vivo* – podać zwierzętom androgeny i zastymulować biosyntezę estrogenów. Tego typu doświadczenia były już prowadzone na różnych grupach mięczaków, jednak nie otrzymywano jednoznacznych rezultatów, wskazujących, że małże pobierają steroidy ze środowiska. Dopiero prace Schwarz i innych z 2017 i 2018 roku potwierdziły, że małże z gatunku *M. trossulus* są w stanie pobierać z wody progesteron [64], testosteron [65] oraz 17β -estradiol [66]. Wiosną 2018 roku podjęłam się przeprowadzenia eksperymentu ekspozycyjnego. Pojedyncze osobniki umieściłam w szklanych zlewkach i podałam im znakowane izotopowo androgeny: androstendion- $^{13}\text{C}_3$ i testosteron- $^{13}\text{C}_3$. Aby umożliwić małżom reakcję aromatyzacji pobranych substratów do estrogenów- $^{13}\text{C}_3$, inkubację przeprowadzono początkowo w temperaturze 6°C a po dwóch godzinach podniesiono temperaturę do 8°C . W ten sposób naśladowano warunki naturalne, gdzie wzrost temperatury wody wydaje się być istotny w przygotowaniu małży do gotowości rozrodczej. Skoro najczęściej wody trytowanej powstawało *in vitro* podczas inkubacji frakcji subkomórkowych (mitochondriów i mikrosomów) w temperaturze 8°C , postanowiłam wykorzystać tę temperaturę w eksperymencie *in vivo*. Zaproponowane warunki inkubacji okazały się dobrze dobrane: małże wchłonęły androgeny; w tkankach oznaczono metodą LC-MS/MS zarówno $\text{A-}^{13}\text{C}_3$ i $\text{T-}^{13}\text{C}_3$ jak również zsyntetyzowane estrogeny. W wyniku reakcji aromatyzacji w tkankach omułek powstał estron- $^{13}\text{C}_3$ oraz 17β -estradiol- $^{13}\text{C}_3$ (Ryc. 3). Tym samym po raz pierwszy wykazaliśmy, że mięczaki takie jak małże z gatunku *M. trossulus* są w stanie syntetyzować estrogeny.



Rycina 3. Stężenie $\text{A-}^{13}\text{C}_3$: androstendionu- $^{13}\text{C}_3$, $\text{T-}^{13}\text{C}_3$: testosteronu- $^{13}\text{C}_3$, $\text{E1-}^{13}\text{C}_3$: Estronu- $^{13}\text{C}_3$ i $17\beta\text{E2-}^{13}\text{C}_3$: 17β -estradiolu- $^{13}\text{C}_3$ oznaczone w tkankach *M. trossulus* poddanych ekspozycji na androstendion- $^{13}\text{C}_3$ (czarne kolumny) i testosteron- $^{13}\text{C}_3$ (szare kolumny). Wartości przedstawiają średnie \pm SD (n = 10).

Podsumowując, hormony płciowe, które są wykrywane w tkankach małży mogą być pochodzenia zarówno egzogenne jak i endogenne. Zwierzęta mogą pobierać steroidy ze środowiska. Omułki mogą również, w wąskim oknie temperaturowym, same syntetyzować estrogeny. Wyższa aktywność „aromatazy” została oznaczona we frakcji mitochondrialnej mięczaków, odmiennie od aromatazy kręgowców, której aktywność jest związana wyłącznie z frakcją mikrosomalną. Poza tym, niewrażliwość „aromatazy” małży na inhibitory takie jakie letrozol i anastrozol, sugeruje, że białko to musi mieć odmienną budowę od aromatazy ssaków, chociaż zapewne należy do rodziny cytochromów P450 (z uwagi na fakt hamowania „aromatazy” małży przez ketokonazol).

- IV. Wykazanie zmian anatomopatologicznych w tkankach *M. trossulus* narażonych na oddziaływanie związków typu EDs (ang. Endocrine Disruptors); w badaniach środowiskowych i po ekspozycji na sztuczny estrogen - 17 α -etynyloestradiol

H3. Katarzyna Smolarz, **Anna Hallmann**, Sandra Zabrzeńska, Anna Pietrasik, 2017, Elevated gonadal atresia as biomarker of endocrine disruptors: field and experimental studies using *Mytilus trossulus* (L.) and 17-alpha ethinylestradiol (EE2), Mar. Pollut. Bull., 120, 58-67, IF:3,241 (MNIŚW=40)

Publikacja, która zamyka cykl badań wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej, przedstawia, jakie mogą być konsekwencje dla bezkręgowców morskich, obecności w środowisku związków o charakterze EDs (ang. Endocrine Disruptors), zaburzających fizjologię małży i ich zdolność rozrodczą. Podczas badań terenowych w czerwcu 2013 r. zebrano omułki jadalne z trzech obszarów Zatoki Gdańskiej; z punktu A – miejsca leżącego w pobliżu ujścia wód z oczyszczalni ścieków Dębogórze (potencjalna obecność EDs), B - punktu leżącego w pobliżu zatopionego statku s/s Stuttgart (z wyciekami ropy naftowej) oraz punktu C – stacja referencyjna leżąca w głębi Zatoki Gdańskiej, daleko od potencjalnych źródeł zanieczyszczeń. Pierwsze obserwacje dotyczyły oceny czynnika SR (ang. sex ratio – stosunek płci, ilość samic/ilość samców) u zebranych zwierząt. Małże z punktu C (referencja) miały prawidłowy czynnik SR = 1, czyli występowało tyle samo samic jak i samców. Mięczaki z punktu A charakteryzowały się dominacją samców (R = 0,76), zaś z punktu B – stwierdzono dominację samic (SR = 1,54). Indeks gonad (GI) był podobny u małży z wszystkich trzech punktów poboru, wynosił około GI = 3, co oznacza, że gonady były dojrzałe a zwierzęta przygotowywały się do rozrodu. W każdej grupie przebadanych małży zaobserwowano trzy rodzaje patologii gonad (z różną częstością występowania): zmiany regresywne, zmiany typu atrezji i gonady interseksualne. Najczęściej zidentyfikowane zmiany obejmowały atrezję i regresję gonad. U małży z punktu A i B stwierdzono te zmiany u ponad 30% zwierząt, głównie u samic. Dodatkowo odnotowano również występowanie u tych małży gonad obojnaczych. Zaobserwowano także występowanie kilku przypadków neoplazji: nowotworu złośliwego gonad (łac. *germinoma*) oraz białaczki (neoplazja hemocytna). Większość małży z punktu referencyjnego C charakteryzowało się brakiem anomalii w budowie gonad, atrezję stwierdzono u jednej samicy a regresję u dwóch osobników. Mięczaki pobrane z punktów środowiskowych wykazały nieprawidłowości w budowie, ale etiologia tych zaburzeń pozostawała nieznaną. W związku z tym, zaplanowano eksperyment ekspozycyjny, aby wykazać, czy zmiany typu np. atrezji i regresji mogą być indukowane (np. związkami typu EDs). Z uwagi na wykazanie w moich badaniach obecności 17 α -etynyloestradiolu (EE2) w tkankach małży zebranych z okolic ujścia wód z oczyszczalni ścieków Dębogórze (wyniki opisano w publikacji **H2**) podjęto się przeprowadzenia eksperymentu ekspozycyjnego polegającego na dwutygodniowej ekspozycji omułków na EE2 w stężeniach 0,5 i 500 ng/L. 17 α -etynyloestradiol ma dłuższy okres półtrwania niż naturalne estrogeny przez co może ulegać bioakumulacji w łańcuchu troficznym. Po zakończeniu eksperymentu zaobserwowano postępującą atrezję (autolizę) w gonadach męskich (niezależnie od stężenia EE2), potwierdzając, że proces autolizy

może być indukowany związkami typu EDs takimi jak EE2. W rezultacie, nieprawidłowa spermatogeneza oraz przedwczesna resorpcja gamet prowadzą do zmniejszonej liczby ruchliwych plemników i dojrzałych oocytów, a w konsekwencji do zaburzeń płodności. Zmniejszona płodność wraz ze zwiększoną śmiertelnością skutkują zaburzeniami liczebności populacji, które w rejonach o niskiej bioróżnorodności i krótkich łańcuchach troficznych, mogą niekorzystnie oddziaływać na funkcjonowanie ekosystemu.

Podsumowanie:

W ramach realizacji celów badawczych objętych osiągnięciem naukowym:

1. Zoptymalizowano procedurę ekstrakcji steroidów z matrycy biologicznej jaką jest tkanka małży poprzez enzymatyczne trawienie tkanki, użycie metanolu jako rozpuszczalnika, wykorzystanie w SPE kolumn z wypełnieniem hydrofilowo-lipofilowym HLB, zastosowanie metody oznaczania hormonów steroidowych w oparciu o technikę chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS).
2. Oznaczono stężenia płciowych hormonów steroidowych w tkankach bałtyckich małży *M. trossulus* z uwzględnieniem różnic wynikających z rodzaju tkanki, w której były oznaczane: w skrzelach odnotowano wyższe stężenia niż w gonadach. Samce charakteryzowały się wyższym stężeniem testosteronu niż samice, natomiast u samic była większa zawartość estrogenów (E1, E2 i E3). Stwierdzono różnice sezonowe – wysokie stężenia steroidów oznaczono w tkankach małży wiosną i latem, niższe jesienią i zimą. Jednak sezonowe zmiany poziomu steroidów w tkankach omułków nie zawsze korelowały ze stopniem dojrzewania gonad. Ilość hormonów zmieniała się również u małży bałtyckich w zależności od głębokości, na której żyją, wyższe stężenia odnotowano w tkankach zwierząt żyjących na głębokości 20 metrów. U zwierząt zebranych z punktów znajdujących się w bliskiej odległości od oczyszczalni ścieków Dębogórze stwierdzono obecność syntetycznego estrogenu - 17 α -etynyloestradiolu.
3. Jednoznacznie potwierdzono, że małże z gatunku *M. trossulus* mogą pobierać ze środowiska androgeny jak również syntetyzować estrogeny. Oznaczona aktywność „aromatazy” w tkankach mięczaków jest wysoka, pod warunkiem, że proces aromatyzacji substratu (1 β -³H androstendionu) jest prowadzony w temperaturze 8°C. Najwyższe aktywności „aromatazy” są oznaczane w tkankach małży zebranych w sezonie wiosennym (bez różnic tkankowych). Oprócz aktywności „aromatazy” we frakcji mikrosomalnej stwierdzono również zdolność aromatyzacji androgenów przez mitochondria małży (nawet o wyższej aktywności). Enzym oznaczony u *M. trossulus* jest niewrażliwy na selektywne inhibitory ludzkiej aromatazy, (jedynie ketokonazol hamuje skutecznie stopień proces aromatyzacji) co wskazuje na odmienną budowę enzymu należącego do cytochromów P450. Doświadczenie ekspozycyjne jednoznacznie wykazało, że małże pobierają androgeny (znakowany izotopowo androstendion i testosteron) i przekształcają je do estrogenów (powstał znakowany estron i 17 β -estradiol)
4. Wykazano zmiany typu regresji i atrezji w tkankach rozrodczych *M. trossulus* narażonych na oddziaływanie związków typu EDs (ang. Endocrine Disruptors) skutkujące zaburzeniem rozrodczości tych zwierząt i wpływające na indeks SR (ang. sex ratio). Zmiany anatomopatologiczne stwierdzono zarówno u małży pobranych z punktów: położonego w pobliżu oczyszczalni ścieków oraz przy wraku s/s Stuttgart, oraz po ekspozycji na sztuczny estrogen - 17 α -etynyloestradiol.

Uzyskane przeze mnie wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad steroidogenezą bałtyckich małży. Wykrycie aktywnej aromatyzacji androgenów przez omułka jadalnego *Mytilus trossulus* wskazuje ten gatunek jako organizm modelowy wśród mięczaków morskich do badań

związków o charakterze EDs (ang. Endocrine Disruptors). Poszerza to możliwości bioindykacyjne małży i może mieć charakter aplikacyjny w monitoringu ekosystemu bałtyckiego.

Prowadzone prace naukowo-badawcze, stanowiące jednotematyczny cykl publikacji, były w większości finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach uzyskanego przeze mnie grantu NCN 30407440. Dodatkowe wsparcie finansowe pozyskałam od Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w formie grantu „badania własne” w 2010. Tematyka podjętych badań miała charakter interdyscyplinarny i wymagała współpracy z innymi ośrodkami badawczymi i instytutami. Zadania wynikające z projektu badawczego realizowane były we współpracy z Zakładem Funkcjonowania Ekosystemów Morskich Instytutu Oceanografii Uniwersytetu Gdańskiego oraz we współpracy z Katedrą i Zakładem Chemii Farmaceutycznej GUMed.

Piśmiennictwo:

- [1] D.D. Hagermann, F.M. Wellington, C. Vilee, Estrogens in marine invertebrates, *Biol. Bull.* 112 (1957) 180-183.
- [2] S. Rohlack, Über das vorkommen von sexualhormonen bei der Meeresschnecke *Littorina littorea* L., *Z. Vergl. Physiol.* 42 (1959) 161-180.
- [3] L.J. Guillette, Contaminant-induced endocrine disruption in wildlife, *Growth Horm. IGF Res.* (2000). doi:10.1016/S1096-6374(00)80009-X.
- [4] A.P. Scott, Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I: Critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids, *Steroids*. 77 (2012) 1450–1468. doi:10.1016/j.steroids.2012.08.009.
- [5] A.P. Scott, Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? II. Critical review of the evidence that steroids have biological effects, *Steroids*. 78 (2013) 268–281. doi:10.1016/j.steroids.2012.11.006.
- [6] S. Carreau, M. Drosowsky, The in vitro biosynthesis of steroids by the gonad of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L.), *Gen. Comp. Endocrinol.* (1977). doi:10.1016/0016-6480(77)90116-2.
- [7] I. Ketata, F. Guerrazi, T. Rebai, A. Hamza-Chaffai, Variation of steroid concentrations during the reproductive cycle of the clam *Ruditapes decussatus*: A one year study in the gulf of Gabès area, *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* (2007). doi:10.1016/j.cbpa.2007.01.017.
- [8] G.A. LeBlanc, M.P. Gooding, R.M. Sternberg, Testosterone-fatty acid esterification: A unique target for the endocrine toxicity of tributyltin to gastropods, in: *Integr. Comp. Biol.*, 2005. doi:10.1093/icb/45.1.81.
- [9] M.P. Gooding, G.A. LeBlanc, Seasonal variation in the regulation of testosterone levels in the eastern mud snail (*Ilyanassa obsoleta*), *Invertebr. Biol.* (2004). doi:10.1111/j.1744-7410.2004.tb00158.x.
- [10] C.K. Jana, E. Ali, Antibody binding characteristics of geometrical isomers of testosterone 3-(O-carboxymethyl)oxime, *Steroids*. (1999). doi:10.1016/S0039-128X(98)00082-8.
- [11] C. Lee, D.E. Goeger, Interference of 6 β -hydroxycortisol in the quantitation of urinary free cortisol by immunoassay and its elimination by solid phase extraction, *Clin. Biochem.* (1998). doi:10.1016/S0009-9120(98)00025-3.
- [12] H. Yan, Q. Li, W. Liu, Q. Ke, R. Yu, L. Kong, Seasonal changes of oestradiol-17 β and testosterone concentrations in the gonad of the razor clam *Sinonovacula constricta* (Lamarck, 1818), *J. Molluscan Stud.* 77 (2011) 116–122. doi:10.1093/mollus/eyq045.
- [13] Q. Li, M. Osada, T. Suzuki, K. Mori, Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 β on vitellogenesis in the pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Invertebr. Reprod. Dev.* 33 (1998) 87–93. doi:10.1080/07924259.1998.9652345.
- [14] A. Viarengo, L. Canesi, Mussels as biological indicators of pollution, *Aquaculture*. (1991). doi:10.1016/0044-8486(91)90120-V.
- [15] A. Ameryk, B. Podgórska, Z. Witek, The dependence between bacterial production and environmental conditions in the Gulf of Gdańsk, *Oceanologia*. (2005).
- [16] A.P. Scott, T. Ellis, Measurement of fish steroids in water—a review, *Gen. Comp. Endocrinol.* (2007). doi:10.1016/j.ygcen.2006.11.006.
- [17] R. Bose, C. Majumdar, S. Bhattacharya, Steroids in *Achatina fulica* (Bowdich): Steroid profile in haemolymph and in vitro release of steroids from endogenous precursors by ovotestis and albumen gland, *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* (1997). doi:10.1016/S0742-8413(96)00163-6.
- [18] D. De Longcamp, P. Lubet, M. Drosowsky, The in vitro biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*), *Gen. Comp. Endocrinol.* (1974). doi:10.1016/0016-6480(74)90093-8.
- [19] A. Di Cosmo, C. Di Cristo, M. Paolucci, A Estradiol-17 β receptor in the reproductive system of the female of *Octopus vulgaris*:

- Characterization and immunolocalization, *Mol. Reprod. Dev.* (2002). doi:10.1002/mrd.10014.
- [20] D. Fernandes, B. Loi, C. Porte, Biosynthesis and metabolism of steroids in molluscs, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2011). doi:10.1016/j.jsbmb.2010.12.009.
- [21] M. Lu, T. Horiguchi, H. Shiraishi, Y. Shibata, M. Abo, A. Okubo, Identification and quantitation of steroid hormones in marine gastropods by GC/MS, *Bunseki Kagaku* 50 (2001) 247-255
- [22] R. Lavado, G. Janer, C. Porte, Steroid levels and steroid metabolism in the Mussel *Mytilus edulis*: The modulating effect of dispersed crude oil and alkylphenols, *Aquat. Toxicol.* 78 (2006) S65–S72. doi:10.1016/j.aquatox.2006.02.018.
- [23] S.I. Teshima, A. Kanazawa, Biosynthesis of sterols in abalone, *Haliotis gurneri*, and mussel, *Mytilus edulis*, *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* (1974). doi:10.1016/0305-0491(74)90004-2.
- [24] P.A. Voogt, Investigations on the capacity of synthesizing 3 beta-sterols in Mollusca. I. Absence of 3 beta-sterol synthesis in a whelk, *Buccinum undatum* L., *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 75 (1967) 809–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4173499> (accessed January 14, 2019).
- [25] P.A. Voogt, Investigations of the capacity of synthesizing 3 beta-sterols in Mollusca. 3. The biosynthesis of 3 beta-sterols in some archeogastropods., *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 76 (1968) 721–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4178041> (accessed January 14, 2019).
- [26] P.A. Voogt, Biosynthesis of 3-beta-sterols in a snail, *Arion rufus* L., from 1-14C-acetate., *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 75 (1967) 492–500. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4167714> (accessed January 14, 2019).
- [27] D.R. Idler, G.B. Sangalang, A. Kanazawa, Steroid desmolase in gonads of a marine invertebrate, *Placopecten magellanicus* Gmelin, *Gen. Comp. Endocrinol.* (1969). doi:10.1016/0016-6480(69)90194-4.
- [28] O. Bardon, P. Lubet, M.A. Drosdowsky, [Biosynthesis of steroids in a marine gastropod mollusk, *Crepidula fornicata* (Phil.)], *Steroidologia*. 2 (1971) 366–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5153121> (accessed January 14, 2019).
- [29] M. de Jong-Brink, L.P.C. Schot, H.J.N. Schoenmakers, M.J.M. Bergamin-Sassen, A biochemical and quantitative electron microscope study on steroidogenesis in ovotestis and digestive gland of the pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*, *Gen. Comp. Endocrinol.* (1981). doi:10.1016/0016-6480(81)90165-9.
- [30] T. Matsumoto, M. Osada, Y. Osawa, K. Mori, Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation, *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* (1997). doi:10.1016/S0305-0491(97)00233-2.
- [31] M.J.J. Ronis, A.Z. Mason, The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) in vitro and in vivo: Effects of tributyl tin, in: *Mar. Environ. Res.*, 1996. doi:10.1016/0141-1136(95)00069-0.
- [32] O. Le Curieux-Belfond, S. Moslemi, M. Mathieu, G.E. Séralini, Androgen metabolism in oyster *Crassostrea gigas*: evidence for 17beta-HSD activities and characterization of an aromatase-like activity inhibited by pharmacological compounds and a marine pollutant., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78 (2001) 359–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717006> (accessed January 3, 2018).
- [33] C.E. Purdom, P.A. Hardiman, V.J. Bye, N.C. Eno, C.R. Tyler, J.P. Sumpter, Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works, *Chem. Ecol.* (1994). doi:10.1080/02757549408038554.
- [34] P. Matthiessen, D. Arnold, A.C. Johnson, T.J. Pepper, T.G. Pottinger, K.G.T. Pulman, Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms, *Sci. Total Environ.* (2006). doi:10.1016/j.scitotenv.2006.02.007.
- [35] G.H. Panter, R.S. Thompson, N. Beresford, J.P. Sumpter, Transformation of a non-oestrogenic steroid metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity, *Chemosphere.* (1999). doi:10.1016/S0045-6535(98)00572-4.
- [36] B. Ralovich, G.A. Ibrahim, A. Fábíán, M. Herpay, beta-D-glucuronidase (BDG) activity of gram-negative bacteria., *Acta Microbiol. Hung.* 38 (1991) 283–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1817425> (accessed January 14, 2019).
- [37] M. Fahrbach, M. Krauss, A. Preiss, H.-P.E. Kohler, J. Hollender, Anaerobic testosterone degradation in *Steroidobacter denitrificans* – Identification of transformation products, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 2572–2581. doi:10.1016/j.envpol.2010.05.017.
- [38] F.C. Yang, Y.L. Chen, S.L. Tang, C.P. Yu, P.H. Wang, W. Ismail, C.H. Wang, J.Y. Ding, C.Y. Yang, C.Y. Yang, Y.R. Chiang, Integrated multi-omics analyses reveal the biochemical mechanisms and phylogenetic relevance of anaerobic androgen biodegradation in the environment, *ISME J.* (2016). doi:10.1038/ismej.2015.255.
- [39] C.-J. Shih, Y.-L. Chen, C.-H. Wang, S.T.-S. Wei, I.-T. Lin, W.A. Ismail, Y.-R. Chiang, Biochemical Mechanisms and Microorganisms Involved in Anaerobic Testosterone Metabolism in Estuarine Sediments, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1520. doi:10.3389/fmicb.2017.01520.
- [40] M.P. Gooding, G.A. LeBlanc, Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail *Lymnaea obsoleta*, *Gen. Comp. Endocrinol.* (2001). doi:10.1006/gcen.2001.7630.
- [41] A.M. Puinean, J.M. Rotchell, Vitellogenin gene expression as a biomarker of endocrine disruption in the invertebrate, *Mytilus edulis*, *Mar. Environ. Res.* (2006). doi:10.1016/j.marenvres.2006.04.035.

- [42] M.R. Peck, P. Labadie, C. Minier, E.M. Hill, Profiles of environmental and endogenous estrogens in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*, *Chemosphere*. (2007). doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.082.
- [43] Y. Liu, Y. Guan, T. Mizuno, H. Tsuno, W. Zhu, A Pretreatment Method for GC – MS Determination of Endocrine Disrupting Chemicals in Mollusk Tissues, *Chromatographia*. (2009). doi:10.1365/s10337-008-0852-7.
- [44] J. Keay, J.T. Bridgman, J.W. Thornton, The *Octopus vulgaris* Estrogen Receptor Is a Constitutive Transcriptional Activator: Evolutionary and Functional Implications, *Endocrinology*. 147 (2006) 3861–3869. doi:10.1210/en.2006-0363.
- [45] M. Kajiwaru, S. Kuraku, T. Kurokawa, K. Kato, S. Toda, H. Hirose, S. Takahashi, Y. Shibata, T. Iguchi, T. Matsumoto, T. Miyata, T. Miura, Y. Takahashi, Tissue preferential expression of estrogen receptor gene in the marine snail, *Thais clavigera*, *Gen. Comp. Endocrinol.* (2006). doi:10.1016/j.ygcen.2006.03.016.
- [46] S. Barnes, Oestrogens and their promiscuous receptors: confronting reality., *Biochem. Soc. Trans.* (2001). doi:10.1042/0300-5127:0290231.
- [47] J.A. Katzenellenbogen, R. Muthyala, Interactions of exogenous endocrine active substances with nuclear receptors, *Pure Appl. Chem.* (2003). doi:10.1351/pac200375111797.
- [48] G. Castoria, M.V. Barone, M. Di Domenico, A. Bilancio, D. Ametrano, A. Migliaccio, F. Auricchio, Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis, *EMBO J.* (1999). doi:10.1093/emboj/18.9.2500.
- [49] M.A. Cahill, Progesterone receptor membrane component 1: An integrative review, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2007). doi:10.1016/j.jsbmb.2007.02.002.
- [50] P. Thomas, Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models, *Gen. Comp. Endocrinol.* (2012). doi:10.1016/j.ygcen.2011.11.032.
- [51] P. Thomas, Characteristics of membrane progestin receptor alpha (mPR α) and progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1) and their roles in mediating rapid progestin actions, *Front. Neuroendocrinol.* (2008). doi:10.1016/j.yfrne.2008.01.001.
- [52] J. Bobe, Y. Guiguen, A. Fostier, Diversity and biological significance of sex hormone-binding globulin in fish, an evolutionary perspective, *Mol. Cell. Endocrinol.* (2010). doi:10.1016/j.mce.2009.09.017.
- [53] M.E. Baker, Albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates, *J. Endocrinol.* (2002). doi:10.1677/joe.0.1750121.
- [54] S. AbuRuz, J. Millership, L. Heaney, J. McElnay, Simple liquid chromatography method for the rapid simultaneous determination of prednisolone and cortisol in plasma and urine using hydrophilic lipophilic balanced solid phase extraction cartridges, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* (2003). doi:10.1016/j.jchromb.2003.09.044.
- [55] R. Wenne, Microgeographic differentiation of the reproductive cycle of *Macoma balthica* (L.) in the Gulf of Gdańsk (South Baltic). and the relationship between this cycle and energy reserve changes, *Pol. Arch. Hydrob.* 32 (1985) 47-63.
- [56] R. Milczarek, E. Sokołowska, A. Hallmann, K. Kaletha, J. Klimek, NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation inhibit aromatase activity in human placental microsomes., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 110 (2008) 230–5. doi:10.1016/j.jsbmb.2007.11.004.
- [57] R. Lavado, G. Janer, C. Porte, Steroid levels and steroid metabolism in the mussel *Mytilus edulis*: the modulating effect of dispersed crude oil and alkylphenols., *Aquat. Toxicol.* 78 Suppl 1 (2006) S65-72. doi:10.1016/j.aquatox.2006.02.018.
- [58] B.P. Haynes, M. Dowsett, W.R. Miller, J.M. Dixon, A.S. Bhatnagar, The pharmacology of letrozole., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 87 (2003) 35–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14630089> (accessed July 4, 2018).
- [59] A.S. Bhatnagar, The discovery and mechanism of action of letrozole, *Breast Cancer Res. Treat.* 105 (2007) 7–17. doi:10.1007/s10549-007-9696-3.
- [60] G.N. Hortobagyi, A.U. Buzdar, Anastrozole (Arimidex), a new aromatase inhibitor for advanced breast cancer: mechanism of action and role in management., *Cancer Invest.* 16 (1998) 385–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9679529> (accessed July 4, 2018).
- [61] M. DiMattina, N. Maronian, H. Ashby, D.L. Loriaux, B.D. Albertson, Ketoconazole inhibits multiple steroidogenic enzymes involved in androgen biosynthesis in the human ovary., *Fertil. Steril.* 49 (1988) 62–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3257193> (accessed July 5, 2018).
- [62] K. Nagai, I. Miyamori, M. Ikeda, H. Koshida, R. Takeda, K. Suhara, M. Katagiri, Effect of ketoconazole (an imidazole antimycotic agent) and other inhibitors of steroidogenesis on cytochrome P450-catalyzed reactions., *J. Steroid Biochem.* 24 (1986) 321–3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3702414> (accessed July 5, 2018).
- [63] J.H. Van Tyle, Ketoconazole. Mechanism of action, spectrum of activity, pharmacokinetics, drug interactions, adverse reactions and therapeutic use, *Pharmacotherapy.* (1984). doi:10.1002/j.1875-9114.1984.tb03398.x.
- [64] T.I. Schwarz, I. Katsiadaki, B.H. Maskrey, A.P. Scott, Uptake and metabolism of water-borne progesterone by the mussel, *Mytilus* spp. (Mollusca), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 178 (2018) 13–21. doi:10.1016/j.jsbmb.2017.10.016.
- [65] T.I. Schwarz, I. Katsiadaki, B.H. Maskrey, A.P. Scott, Rapid uptake, biotransformation, esterification and lack of depuration of testosterone and its metabolites by the common mussel, *Mytilus* spp., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 171 (2017) 54–65.

doi:10.1016/j.jsbmb.2017.02.016.

- [66] T.I. Schwarz, I. Katsiadaki, B.H. Maskrey, A.P. Scott, Mussels (*Mytilus* spp.) display an ability for rapid and high capacity uptake of the vertebrate steroid, estradiol-17 β from water., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 165 (2017) 407–420. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.08.007.

4. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

4.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

W kwietniu 2000 roku rozpoczęłam pracę na stanowisku starszego referenta inżynierijno-technicznego w Katedrze i Zakładzie Biochemii ówczesnej Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny) pod kierunkiem prof. dr hab. Juliana Świerczyńskiego. W początkowym okresie mojej działalności naukowej realizowałam projekt pt. „Wpływ melatoniny podawanej szczurom na peroksydację lipidów w mikrosomach i mitochondriach wątroby”. Wykazałam, że melatonina podawana szczurom *in vivo* nie miała wpływu na zachodzącą *in vitro* NADPH-zależną peroksydację lipidów w mikrosomach i mitochondriach wątroby szczura. Badając *in vitro* bezpośredni efekt melatoniny na NADPH-zależną peroksydację lipidów stwierdziłam, że melatonina w stężeniu 3 mM całkowicie hamuje ten proces zarówno w mikrosomach jak i mitochondriach wątroby szczura. Na podstawie moich wyników wnioskowano, że suplementacja melatoniną osiąga zbyt małe stężenie w wątrobie by znacząco hamować peroksydację lipidów w izolowanych frakcjach subkomórkowych. Wyniki uzyskanych badań przedstawiono na XXXVII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (Toruń 2001) [zał. 2, IIK, str. 6, punkt 2]. Od 2002 roku jestem zatrudniona w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej GUMed i w początkowym okresie naukowej działalności (na etacie asystenta) realizowałam projekty dotyczące stresu oksydacyjnego oraz wynikającego z niego procesu peroksydacji lipidów głównie w łożysku ludzkim. Brałam wówczas udział w badaniach własnych Katedry (ST-40) w tematyce udziału ferrytyny w NADPH-zależnej peroksydacji lipidów w mikrosomach łożyska ludzkiego, pod kierownictwem prof. dr hab. Jerzego Klimka, wyniki badań wygłoszono min. na XXXVIII Zjeździe PTBioch. (Wrocław 2002) [zał. 2, IIK, str. 6-7, punkty 3-6]. W roku 2002 nawiązałam współpracę z Katedrą Chemii Medycznej GUMed kierowaną przez prof. dr hab. Michała Woźniaka i pod jego opieką realizowałam badania, które zakończyły się napisaniem rozprawy doktorskiej i obroną doktoratu. W Katedrze Chemii Medycznej był zatrudniony wizytujący profesor Takashi Wakabayashi z Uniwersytetu Medycznego w Nagoi i głównie pod jego kierunkiem rozszerzałam swoją działalność naukową, badając metabolizm linii komórek nowotworowych (*choriocarcinoma* oraz *osteosarcoma*) i ich odpowiedź na potencjalne leki przeciwnowotworowe. Na finansowanie moich badań pozyskałam grant własny dotowany przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji (2005 – 2007). Podczas prowadzonych badań nabyłam umiejętności pracy z cytometrem przepływowym (dzięki uprzejmości prof. dr hab. Jolanty Myśliwskiej i prof. dr hab. Piotra Trzonkowskiego z ówczesnej Katedry i Zakładu Histologii GUMed), przygotowywałam preparaty komórkowe do analizy przy użyciu mikroskopu konfokalnego (współpracując z dr Janem Spodnikiem z Katedry Anatomii GUMed) i elektronowego (współpracując z profesorem Jiro Usukura, Nagoya University). Współprace zakończyły się realizacją 10 publikacji naukowych [zał. 2, IIA, str. 2-3, punkty 1-5 oraz zał. 2, IID, str. 4-5, punkty 2-6] i 11 doniesień konferencyjnych [zał. 2, IIK, str. 6-8, punkty 8-18, 20].

Promotorem mojej pracy doktorskiej był prof. dr hab. Jerzy Klimek, a jej przedmiotem była ocena cytotoksycznego działania menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru w komórkach *choriocarcinoma*. Rozprawę doktorską obroniłam 2 grudnia 2008 roku.

4.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

W 2009 roku nawiązałam współpracę z dr Katarzyną Smolarz z Zakładu Funkcjonowania Ekosystemów Morskich Instytutu Oceanografii Uniwersytetu Gdańskiego. Korzystając z jej bogatego doświadczenia w pracy nad mięczakami morskimi morza bałtyckiego i moich kompetencji z dziedziny biochemii, postanowiliśmy powołać do życia wspólny projekt interdyscyplinarny. W ramach naszej współpracy zaplanowałyśmy badania mające na celu określenie realnego stanu zagrożenia populacji bezkręgowców morskich Zatoki Gdańskiej ekspozycją na związki zaburzające gospodarkę hormonalną. Badania miały objąć głównie kluczowy gatunek makrofauny dennej jakim jest omułek jadalny (*Mytilus trossulus*) pospolicie występujący w akwenu Bałtyku. W 2010 otrzymałam dofinansowanie z GUMed na te badania – „Wykrywanie i oznaczanie ksenoestrogenów w tkankach *Mytilus edulis trossulus* z zanieczyszczonych rejonów Zatoki Gdańskiej”. Natomiast w 2011 roku został mi przyznany grant z Narodowego Centrum Nauki (NCN 304 07440) - „Wpływ zanieczyszczeń związkami typu EDs (ang. Endocrine Disruptors) na fizjologię rozrodu bezkręgowców morskich Zatoki Gdańskiej” Prowadzone badania dotyczyły analizy stężeń hormonów steroidowych naturalnych i ksenohormonów w tkankach omułka zarówno w wymiarze przestrzennym (kilka stanowisk badawczych) jak i czasowym (zmienność sezonowa). Ponadto, zbadano występowanie różnic w profilu hormonalnym samców i samic omułka. Całość obserwacji opublikowano w pracach **H1** – **H5** i zawarto w osiągnięciu habilitacyjnym. Wyniki tych badań zostały również przedstawione na międzynarodowej konferencji, 7th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, (Hong Kong, 17- 21 czerwiec, 2013) [zał. 2, IIK, str. 9, punkty 28-29], a także na I Konferencji Naukowej Polskich Badaczy Morza 2017 zatytułowanej "Stan i trendy zmian w morzach i oceanach" (Sopot, 19-20 października 2017) [zał. 2, IIK, str. 9, punkty 30-33]. W ramach projektu powstały także prace magisterskie w Instytucie Oceanografii UG i w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej GUMed. Za publikacje **H1**, **H2** i **H3** otrzymałam w 2017 roku Naukową Nagrodę Zespołową II stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego [zał. 2, IIJ, str. 6, punkt 6].

Równolegle z badaniami prowadzonymi na bezkręgowcach morskich brałam udział w projektach prowadzonych w ramach badań statutowych (ST-40) Katedry i Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Katedry Mikroskopii Elektronowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Współpracując z dr Ryszardem Milczarkiem zajmowałam się izolacją mitochondriów z łożyska ludzkiego i pomiarem peroksydacji lipidów w tych subkomórkowych frakcjach, w różnych warunkach doświadczalnych. Badania przedstawiono na konferencjach krajowych [zał. 2, IIK, str. 8, punkty 19-21,25] oraz opublikowano: Milczarek R., Hallmann A., Sokołowska E., Kaletha K., Klimek J.: Melatonin enhances antioxidant action of alfa-tocopherol and ascorbate against NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *J. Pineal Res.* 2010, 48:149-155, (IF: 5,855). Natomiast we współpracy z dr hab. Cecylią Tukaj dokonałam ekstrakcji i pomiaru stężenia nukleotydów adeninowych w szczurzych komórkach mięśniówki gładkiej aorty w warunkach ekspozycji komórek na kalcytriol. Wyniki doświadczeń zostały zaprezentowane na 14 sympozjum dotyczącym badań nad witaminą D (Belgia, 4-8 październik, 2009) [zał. 2, IIK, str. 8, punkt 24] i opublikowane: Tukaj C., Trzonkowski P., Pikuła M., Hallmann A Tukaj S.: Increased migratory properties of aortal smooth muscle cells exposed to calcitriol in culture. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2010,121: 208-211, (IF:2,886).

W 2011 roku, pracowałam również jako wykonawca grantu luventus Plus zatytułowanego „Regulacja ekspresji genu chemeryny w tkance tłuszczowej pacjentów z otyłością olbrzymią” finansowanego przez MNiSW, którego kierownikiem był dr hab. Tomasz Śledziński. Moim zadaniem

badawczym była izolacja i hodowla adipocytów z tłuszczu wewnętrznego i podskórnego od pacjentów z otyłością olbrzymią. Badania zostały przedstawione na Kongresie Towarzystwa Chirurgów Polskich (Łódź, 14-17 września 2011) [zał. 2, IIK, str. 8, punkt 26] oraz na II Kongresie Biochemicznym (Kraków, 5-9 września 2011) [zał. 2, IIK, str. 8, punkt 27] a następnie opublikowane: Śledziński T, Korczyńska J, Hallmann A, Kaska L, Proczko-Markuszczyńska M, Stefaniak T, Śledziński M, Świerczyński J. The increase of serum chemerin concentration is mainly associated with the increase of body mass index in obese, non-diabetic subjects. *J Endocrinol Invest.* 2013 Jun;36(6): 428-34, (IF: 1,55).

W latach 2014-2017 byłem kierownikiem zadania, pakietu WP3 grantu finansowanego przez Polsko-Norweską Współpracę Badawczą oraz Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, realizowanego w GUMed pt. „Impact of potential leakage from the sub-seabed CO₂ storage site on marine environment at relevant hydrostatic pressure” (CO₂Marine). Ten unikatowy projekt badawczy miał na celu określenie wpływu zwiększonego stężenia dwutlenku węgla na procesy geochemiczne w osadach morskich, wodzie nadsennej, oraz w organizmach bentonicznych (małże i wieloszczety) w warunkach zwiększonego ciśnienia hydrostatycznego. W ramach projektu w komorze hiperbarycznej Karl Erik Ti-Tank będącej na wyposażeniu Norweskiego Uniwersytetu Nauki i Technologii (Trondheim, Norwegia) przeprowadzono doświadczenia laboratoryjne badające wpływ acydyfikacji wody morskiej na procesy geochemiczne zachodzące w osadach dennych i na organizmy bentosowe. Zbadano między innymi również wpływ CO₂ w warunkach eksperymentalnych na gatunek kalcyfikujący małża *Limecola balthica* i niekalcyfikujący wieloszczeta *Hediste diversicolor* należących do mikrofauny bentosowej, zasiedlające rejon potencjalnego podmorskiego składowiska dwutlenku węgla w polskiej części Morza Bałtyckiego. Moja obecność w Norwegii wiązała się z przeprowadzeniem doświadczeń ekspozycyjnych w komorze hiperbarycznej oraz zabezpieczeniem materiału biologicznego. W Polsce, w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej zajmowałam się oznaczaniem wybranych aktywności enzymatycznych w tkankach zwierząt (m.in. anhidrazy węglanowej - CA, dehydrogenazy jabłczanowej - MDH i mleczanowej - LDH oraz enzymów antyoksydacyjnych: katalazy - CAT, dysmutazy ponadtlenkowej - SOD i peroksydazy glutationowej – GPx). Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane na I Konferencji Naukowej Polskich Badaczy Morza 2017 zatytułowanej "Stan i trendy zmian w morzach i oceanach" (Sopot, 19-20 października 2017) [zał. 2, IIK, str. 9, punkt 31]. Aktualnie trwają prace nad przygotowaniem manuskryptów do publikacji.

Podczas pobytu w Trondheim w NTNU nawiązałam kontakt z dr Tomaszem Ciesielskim. Współpraca dotyczyła analizy markerów stresu oksydacyjnego u kalanusa (widłonóg) - *Calanus finmarchicus* – gatunku, który wchodzi w skład zooplanktonu Morza Północnego i Norweskiego. W eksperymencie ekspozycyjnym kalanusa na H₂O₂ (nadtlenek wodoru jest wykorzystywany jako środek przeciwpasożytniczy u łososi hodowlanych), zbadalam aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz ilość powstałych produktów peroksydacji lipidów (MDA). Zastosowane stężenie (0,75 mg/L) H₂O₂, w przeprowadzonym doświadczeniu ekspozycyjnym, nie wpłynęło na odpowiedź antyoksydacyjną tkanek widłonogów, nie odnotowano również istotnych statystycznie zmian w ilości GSH czy MDA. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy: Hansen BH, Hallmann A, Altin D, Jenssen BM, Ciesielski TM. Acute hydrogen peroxide (H₂O₂) exposure does not cause oxidative stress in late-copepodite stage of *Calanus finmarchicus*. *J. Toxicol. Environ. Health – Part A* 2017; vol. 80, nr 16-18, s. 820-829 (IF: 2,73). Kontynuując dalszą współpracę zajęłam się oznaczeniem markerów stresu oksydacyjnego u gatunku *Calanus finmarchicus* poddanemu działaniu wodnej frakcji (WAF) ropy naftowej (wydobywanej z Morza Północnego). Zaobserwowałam znaczący wzrost aktywności transferazy glutationowej (GST), zwiększenie ilości MDA oraz wzrost stężenia GSH w grupie

widłonogów ekspozowanej na olej naftenowy (frakcja ropy naftowej), co wskazuje, że głównym powodem śmiertelności *C. finmarchicus* w tych warunkach eksperymentalnych jest indukcja peroksydacji lipidów i nagromadzenie się jej produktów (np. MDA). Doświadczenia prowadzono w ramach grantu Horyzont 2020, projektu GRACE (N 679266). Wyniki badań zostaną zaprezentowane na najbliższej konferencji SETAC, w maju 2019 roku oraz umieszczone w przygotowywanym manuskrypcie.

Kolejny projekt, w który jestem obecnie zaangażowana jest zatytułowany "Zakaźna neoplazja? Rola horyzontalnego transferu komórek nowotworowych w etiologii neoplazji u małży z Zatoki Gdańskiej". Grant N 2017/26/M/NZ8/00478 (HARMONIA 9, 2018-2021) jest finansowany przez Narodowe Centrum Nauki i w ramach umowy konsorcjum jestem kierownikiem zadań realizowanych w GUMed. Projekt, kierowany przez dr Katarzynę Smolarz ma charakter współpracy międzynarodowej i oprócz UG partnerami są Instytut Medyczny Uniwersytetu Columbia (USA) jak również Centro de Investigaci3n Mariñas (CIMA) z Hiszpanii. Celem projektu jest zbadanie, czy neoplazja u małży z Zatoki Gdańskiej jest chorobą zakaźną związaną z występowaniem horyzontalnego transferu komórek nowotworowych między osobnikami tego samego gatunku jak i między gatunkami. Zadaniem badawczym realizowanym w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej jest między innymi cytometryczna analiza komórek izolowanych od zdrowych małży i mięczaków z neoplazją. Obecnie zajmuję się porównaniem funkcjonowania mitochondriów izolowanych od zdrowych i neoplastycznych małży używając do tego analizatora Agilent Seahorse XFp, działającego na zasadzie elektrody tlenowej. W kolejnych etapach realizacji projektu będę zajmowała się oznaczaniem aktywności enzymatycznych mogących różnicować tkanki zdrowe od tkanek objętych neoplazją.

Z racji tego, że aktywnie uczestniczę w projektach interdyscyplinarnych, w 2017 roku zostałam zaproszona jako ekspert do Zespołu Zadaniowego ds. Opinii i Rozwoju Biologii Morza działającego przy Sekcji Biologii Morza Komitetu Badań Morza w kadencji 2016 – 2020.

5. Nagrody i wyróżnienia

Za działalność naukową otrzymałam nagrody i wyróżnienia. W 2003 roku wyróżniono moją prezentację „ Some characterization of human *choriocarcinoma* cell line JAR cells against oxidative stress” na XI Międzynarodowej Studenckiej Konferencji Naukowej dla Studentów Medycyny i Młodych Lekarzy w Gdańsku. W uznaniu za prace badawcze w latach 2005-2017 uzyskałam łącznie pięć Naukowych Nagród Zespołowych Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego: 3 nagrody I stopnia w latach 2005, 2009, 2011 i 2 nagrody II stopnia w latach 2014, 2017 i [zał. 2, III, str.6, punkty 1-6].

6. Działalność dydaktyczna i organizacyjna

Od 2002 roku prowadzę zajęcia dydaktyczne dla studentów II roku kierunku farmacja i analityka medyczna w ramach przedmiotu biochemia. W latach 2000 – 2002 prowadziłam również ćwiczenia z biochemii dla studentów II roku kierunku lekarskiego i ED. W latach 2001 – 2018 byłam opiekunem 20 prac magisterskich zakończonych uzyskaniem tytułu magistra przez studentów Wydziału Farmaceutycznego z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Od 2009 roku jestem również zatrudniona jako wykładowca Uniwersytetu Humanistycznospołecznego (SWPS) w Wydziale Zamiejscowym w Sopocie, gdzie wykladałam przedmiot biologia medyczna dla studentów I roku fizjoterapii a aktualnie prowadzę zajęcia z przedmiotu biologiczne podstawy zachowania dla studentów I roku psychologii i psychoseksuologii. W celu zwiększenia moich kompetencji dydaktycznych ukończyłam w 2019 roku kurs z umiejętności zastosowania platformy e-learningowej „Moodle” w

procesie dydaktycznym oraz szkolenie z zakresu „Problem based learning” zorganizowane w ramach projektu „Rozwój kompetencji kadry dydaktycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020.

Od 10 lat współpracuję z Zakładem Funkcjonowania Ekosystemów Morskich Instytutu Oceanografii Uniwersytetu Gdańskiego. Dzięki tej współpracy studenci oceanografii mieli okazję uczestniczyć w badaniach biochemicznych i poszerzać swoją wiedzę w temacie fizjologii i biochemii bezkręgowców morskich. Na bazie prowadzonych pod moim kierunkiem doświadczeń mających na celu określenie stężeń hormonów płciowych u omułek została napisana i obroniona praca magisterska pt. „Płciowe hormony steroidowe w tkankach małży *Mytilus trossulus* z Zatoki Gdańskiej: zmienność w obrębie płci z uwzględnieniem zmian w stężeniu steroidów” – autor mgr Sandra Zabrzeńska. Obecnie, w fazie końcowej znajduje się przygotowanie rozprawy doktorskiej pt. „Wpływ potencjalnego wycieku CO₂ z podmorskiego składowiska w Południowym Bałtyku na rogowca bałtyckiego *Limecola balthica* w warunkach zwiększonego ciśnienia hydrostatycznego” – autor mg Justyna Świeżak, której część metodyczna, w większości, została wykonana pod moim kierunkiem w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej. Studenci farmacji i analityki medycznej również mieli okazję zaznajomić się z badaniami z zakresu oceanografii – magistranci prowadzili doświadczenia na grupie bezkręgowców morskich (bałtyckie małże i wieloszczety), jak również mieli okazję uczestniczyć w poborze prób podczas rejsów statkiem „Oceanograf”. Dzięki interdyscyplinarnym projektom powstało na Wydziale Farmaceutycznym z OML sześć prac magisterskich a kolejna jest w trakcie realizacji. Współpraca GUMedu oraz Uniwersytetu Gdańskiego jest bardzo korzystna dla obu stron, dzięki niej pozyskaliśmy finansowanie naszych badań na sumę ponad 5 mln złotych (granty NCN + grant Polsko-Norweski).

W zakresie działalności organizacyjnej byłam członkiem Komitetu Organizacyjnego XXXIX Naukowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Gdańsku, który odbył się w dniach 16-20 września 2003 roku pod patronatem Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (dawnej Akademii Medycznej w Gdańsku). Natomiast w dniach 27-29 maja 2005 roku aktywnie uczestniczyłam w organizacji Konferencji Kierowników Katedr Biochemii Uczelni Medycznych w Polsce (Sulęcyno). Od 2005 roku przez 2 lata byłam również członkinią Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Jestem założycielką i od roku 2014 opiekunem Studenckiego Koła Naukowego „Biochemicy” działającego przy Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej GUMed. Studenci oprócz realizacji prac naukowych są zaangażowani w propagowanie wiedzy biologicznej i medycznej w szkołach podstawowych i średnich. W 2015 roku z inicjatywy SKN zorganizowano warsztaty genetyczne, na które zaproszono młodzież III klasy gimnazjum Gdyńskiej Szkoły Społecznej. „Biochemicy” biorą również czynny udział w organizowanych cyklicznie przez GUMed Dniach Otwartych – "Nauka dla Zdrowia".

W latach 2014 – 2016 byłam opiekunem V roku Analityki Medycznej.

W ramach działalności na rzecz lokalnej społeczności zostałam wybrana Radną Dzielnicy Gdynia Grabówek w kadencji 2019 – 2023.

Anne Hallmann